



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 25 601 T2** 2005.04.28

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 009 802 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 25 601.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/03024**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 906 490.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/035012**

(86) PCT-Anmeldetag: **11.02.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **13.08.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **11.08.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.04.2005**

(51) Int Cl.7: **C12M 1/34**
C12Q 1/68

(30) Unionspriorität:

37921 P	12.02.1997	US
64687 P	05.11.1997	US

(73) Patentinhaber:

Chan, Eugene Y, Brookline, Mass., US

(74) Vertreter:

**Patentanwälte
HANSMANN-KLICKOW-HANSMANN, 22767
Hamburg**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

Chan, Eugene Y., Brookline, US

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR ANALYSE VON POLYMEREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund

[0001] Die Untersuchung der Molekular- und Zellbiologie konzentriert sich auf die makroskopische Struktur von Zellen. Wir wissen nun, daß Zellen eine komplexe Mikrostruktur aufweisen, die Funktionalität der Zelle bestimmt. Der Großteil der mit der Zellstruktur und -funktion verbundenen Vielfalt ist auf die Fähigkeit einer Zelle zurückzuführen, verschiedene Bausteine zu diversen chemischen Verbindungen zusammenzubauen. Die Zelle bewerkstelligt diese Aufgabe durch Zusammenbauen von Polymeren aus einem begrenzten Satz von Bausteinen, die als Monomere bezeichnet werden. Der Schlüssel zu der vielfältigen Funktionalität von Polymeren basiert auf der Primärsequenz der Monomere innerhalb des Polymers und ist integraler Bestandteil des Verständnisses der Grundlage der Zellfunktion, wie beispielsweise, warum sich eine Zelle in einer bestimmten Weise differenziert oder wie eine Zelle auf eine Behandlung mit einem bestimmten Arzneimittel antworten wird.

[0002] Die Fähigkeit, die Struktur von Polymeren durch Identifizieren von deren Sequenz von Monomeren zu identifizieren, ist wesentlich für das Verständnis jedes wirksamen Bestandteils sowie der Rolle, die dieser Bestandteil innerhalb der Zelle spielt. Durch Feststellen der Sequenzen von Polymeren ist es möglich, Expressionskarten zu erzeugen, um festzustellen, welche Proteine exprimiert werden, zu verstehen, wo Mutationen in einem Krankheitsstadium auftreten und festzustellen, ob ein Polysaccharid eine bessere Funktion aufweist oder seine Funktion verliert, wenn ein bestimmtes Monomer abwesend oder mutiert ist.

[0003] Expressionskarten betreffen die Bestimmung von mRNA-Expressionsmustern. Die Notwendigkeit, differentiell exprimierte mRNA zu identifizieren, ist kritisch für das Verständnis sowohl der zeitlichen als auch der räumlichen genetischen Programmierung. Verschiedene Gene werden während des zeitlichen Verlaufs der Lebensentwicklung eines Organismus, umfassend Embryonal-, Wachstums- und Alterungsstadien, an- und abgeschaltet. Über die Entwicklungsveränderungen hinaus gibt es auch temporäre Änderungen in der Antwort auf verschiedene Stimuli wie beispielsweise Verletzung, Arzneimittel, Fremdkörper und Streß. Die Möglichkeit, Expressionsänderungen für bestimmte Gruppen von Zellen über die Zeit entweder in Antwort auf Stimuli oder beim Wachstum zu kartieren, erlaubt die Erzeugung von dem, was eine zeitliche Expressionskarte genannt wird. Auf der anderen Seite gibt es auch Körperexpressionskarten, die Kenntnisse über differentiell exprimierte Gene für verschiedene Gewebe und Zelltypen enthalten. Expressionskarten unterscheiden sich nicht nur von Art zur Art und von Individuen zu Individuum, sondern auch zwischen Krankheits- und krankheitsfreien Stadien. Die Untersuchung der differentiellen Geneexpression hat in vielen verschiedenen Disziplinen, wie u. a. beispielsweise der Signaltransduktion (Smith et al., 1990), bei circadianen Rhythmen (Loros et al., 1989), der Fruchtereifung (Wilinson et al., 1995), Zellzykluskontrolle (el-Deiry et al., 1993), Apoptose (Woronicz et al., 1994) und ischämiebedingter Schädigung (Wang et al., 1995) Schlüsselentdeckungen von Genen hervorgebracht. Da die Erzeugung von Expressionskarten die Sequenzierung und Identifizierung von cDNA oder mRNA beinhaltet, bedeutet eine raschere Sequenzierung notwendigerweise eine raschere Erzeugung von vielen Expressionskarten.

[0004] Derzeit sind nur 1% des menschlichen Genoms und eine sogar noch geringere Menge von anderen Genomen sequenziert worden. Darüber hinaus ist nur eine sehr unvollständige menschliche Körperexpressionskarte unter Verwendung von "expressed sequence tags" angelegt worden (Adams et al., 1995). Derzeitige Verfahren für genomische Sequenzierungen sind langsam und beinhalten aufwendige Schritte wie zum Beispiel Klonieren, Erzeugen genomischer Bibliotheken, Picken von Kolonien und Sequenzieren. Die Zeit, um eine selbst partielle genomische Bibliothek zu erzeugen, liegt im Bereich von mehreren Monaten. Selbst nach der Erstellung von Bibliotheken ergeben sich Zeitverzögerungen in der Herstellung von DNA zur Sequenzierung und dem Durchführen der jeweiligen Sequenzierungsschritte. Aufgrund des Multiplikationseffekts dieser ungünstigen Tatsachen ist es evident, daß die Sequenzierung selbst von nur einem Genom eine enorme Investition von Geld, Zeit und Anstrengung erfordert.

[0005] Im allgemeinen wird die DNA-Sequenzierung derzeit unter Verwendung von zwei Verfahren durchgeführt. Das erste und bekanntere Verfahren ist das von Sanger et al. (1977) beschriebene Dideoxy-Kettenabbruch-Verfahren. Dieses Verfahren beinhaltet die enzymatische Synthese von DNA-Molekülen, die bei Dideoxy-Nukleotiden abbrechen. Durch Verwendung der vier ddNTPs kann eine Population von Molekülen synthetisiert werden, die jeweils an jeder Position der Ziel-DNA abbrechen. Die nachfolgende Analyse ergibt Informationen über die Länge der DNA-Moleküle und der Base, an der jedes Molekül endet (entweder A, C, G oder T). Mit dieser Information kann die DNA-Sequenz bestimmt werden. Das zweite Verfahren ist die Maxam-und-Gilbert-Sequenzierung (Maxam und Gilbert, 1977), die einen chemischen Abbau zur Erzeugung einer Population von Molekülen, die an bestimmten Positionen der Ziel-DNA abgebaut sind, einsetzt. In Kennt-

niss der Spaltspezifitäten der chemischen Reaktionen und der Länge der Fragmente wird die DNA-Sequenz erzeugt. Beide Verfahren beruhen auf der Polyacrylamidgelelektrophorese und der fotografischen Visualisierung der radioaktiven DNA-Fragmente. Jeder Vorgang dauert 1–3 Tage. Die Sanger-Sequenzierungsreaktionen können nur 300–800 Basen in einem Lauf erzeugen.

[0006] Verfahren zur Verbesserung des Ertrags von Sequenzinformationen unter Verwendung der Sanger-Methode sind vorgeschlagen worden. Diese Sanger-basierten Verfahren beinhalten Multiplex-Sequenzierung, Kapillargelelektrophorese und automatisierte Gelelektrophorese. Seit kurzem gibt es auch ein steigendes Interesse an der Entwicklung von Verfahren, die von Sanger unabhängig sind. Verfahren, die von Sanger unabhängig sind, verwenden eine völlig andere Methodik, um die Basisinformation zu erstellen. Diese Kategorie beinhaltet die neuesten Techniken, einschließlich Rasterelektronenmikroskopie (STM), Massenspektrometrie, Sequenzierung mittels luminometrischem Enzymtest auf anorganisches Pyrophosphat (enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay, ELIDA), Exonuklease-Sequenzierung und Sequenzierung durch Hybridisierung. Eine kurze Zusammenfassung dieser Verfahren ist unten wiedergegeben.

[0007] Gegenwärtig ist die automatisierte Gelelektrophorese das am meisten eingesetzte Verfahren zur Sequenzierung in großem Maßstab. Die Automatisierung erfordert durch Lesen von fluoreszenzmarkierten Sanger-Fragmenten in Echtzeit mit Hilfe eines Ladungskopplungsbauelement (charge-coupled-device, CCD)-Detektors. Die vier verschiedenen Didesoxy-Kettenabbruchreaktionen werden mit verschiedenen markierten Primern durchgeführt. Die Reaktionsmischungen werden kombiniert und zusammen auf einer Platte einer Gelelektrophorese unterzogen. Mittels Laseranregung werden die getrennten DNA-Fragmente am Ende des Gels aufgelöst und die Sequenz wird durch einen Computer bestimmt. Viele automatisierte Maschinen sind kommerziell erhältlich, die jeweils verschiedene Detektionsverfahren und Markierungsschemata einsetzen. Das effizienteste von diesen ist das Modell 377XL von Applied Biosystems, das eine maximale Rate von 115.200 Basen pro Tag ermöglicht.

[0008] Bei dem Verfahren der Kapillargelelektrophorese werden Reaktionsproben durch gefüllte Kapillaren mit geringem Durchmesser analysiert. Der kleine Durchmesser dieser Kapillaren (50 µm) erlaubt die effiziente Ableitung von Wärme, die während der Elektrophorese erzeugt wird. Auf diese Weise können hohe Feldstärken ohne übermäßige Joule-Erwärmung (400 V/m) eingesetzt werden, wodurch die Trennzeit auf etwa 20 Minuten pro Reaktionslauf herabgesetzt wird. Nicht nur die Basen werden schneller getrennt, es ergibt sich auch eine erhöhte Auflösung gegenüber der konventionellen Gelelektrophorese. Darüber hinaus werden viele Kapillaren parallel analysiert (Wooley und Mathies, 1995), was die Amplifizierung der erzeugten Basisinformation ermöglicht (die gegenwärtige Rate entspricht 200.000 Basen/Tag). Der wesentliche Nachteil besteht darin, daß es keine kontinuierliche Beladung der Kapillaren gibt, da für jede Reaktion ein neues Kapillarrohr hergestellt werden muß. Kapillargelelektrophorese-Maschinen sind kürzlich kommerziell erhältlich geworden.

[0009] Multiplex-Sequenzierung ist ein Verfahren, das Elektrophoresegele effizienter nutzt (Church und Kiefer-Higgins, 1988). Sanger-Reaktionsproben werden zunächst mit einzigartigen Oligomeren markiert, und anschließend werden bis zu 20 verschiedene Proben in einer Spur des Elektrophoresegeles laufengelassen. Die Proben werden dann auf eine Membran übertragen. Die Membran wird dann nacheinander mit Oligomeren sondiert, die zu den Markern auf den Sanger-Reaktionsproben passen. Die Membran wird gewaschen und erneut aufeinanderfolgend sondiert, bis die Sequenzen aller 20 Proben bestimmt sind. Obwohl sich eine wesentliche Reduzierung der Zahl der Gelläufe ergibt, sind die Waschungs- und Hybridisierungsschritte ebenso aufwendig wie das Laufenlassen von Elektrophoresegelelen. Die gegenwärtige Sequenzierungsrate bis mit der von automatisierten Gelelektrophoresen vergleichbar.

[0010] Sequenzierung durch Massenspektrometrie wurde zuerst in den späten 80er Jahren eingeführt. Kürzliche Entwicklungen auf dem Gebiet ermöglichen eine bessere Sequenzbestimmung (Crain, 1990; Little et al., 1994; Keough et al., 1993; Smimov et al., 1996). Massenspektrometrie-Sequenzierung beinhaltet zunächst die Erzeugung einer Population von verschachtelten ("nested") DNA-Molekülen, die sich in ihrer Länge um eine Base unterscheiden. Die nachfolgende Analyse der Fragmente wird durch Massenspektrometrie vorgenommen. Bei einem Beispiel wurde eine Exonuklease verwendet, um ein 33mer teilweise zu verdauen (Smirnov, 1996). Eine Population von Molekülen mit gleichen 5'-Enden und verschiedenen Punkten für den 3'-Abbruch wird erzeugt. Die Reaktionsmischung wird dann analysiert. Die Massenspektrometrie ist empfindlich genug, um Massendifferenzen zwischen aufeinanderfolgenden Fragmenten zu unterscheiden, was es möglich macht, Sequenzinformationen zu erzeugen.

[0011] Massenspektrometrie-Sequenzierung ist sehr genau, kostengünstig und schnell im Vergleich zu konventionellen Verfahren. Die wesentliche Einschränkung besteht jedoch darin, daß die Leselänge in der Grö-

ßenordnung von einigen zehn Basen liegt.

[0012] Selbst das beste Verfahren, die matrix-unterstützte Laser-Desorptions-/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDITOF) (Smirnov et al., 1996) kann nur maximale Leselängen von 80–90 Basenpaaren erreichen. Viel längere Leselängen sind physikalisch unmöglich aufgrund der Fragmentierung von längerer DNA an Guanidinen während des Analyseschritts. Massenspektrometrie-Sequenzierung ist daher auf die Identifizierung von kurzen Primer-Sequenzen beschränkt und hat keine praktische Anwendung bei der Sequenzierung in großem Maßstab.

[0013] Das Rastertunnelmikroskop (STM)-Sequenzierungsverfahren (Ferrell, 1997) wurde zu der Zeit entwickelt, als das STM kommerziell erhältlich wurde. Das anfängliche Versprechen der Fähigkeit, Basenpaarinformationen direkt aus den elektronenmikroskopischen Mikrophotographien ermitteln zu können, kann nicht länger aufrechterhalten werden. Die DNA-Moleküle müssen auf leitenden Oberflächen angeordnet werden, die normalerweise aus hochgeordnetem pyrolytischen Graphit (HOPG) oder Gold bestehen. Diesen fehlen die Bindungsstellen, um DNA stark genug festzuhalten, damit sie einer Ablösung durch die physikalischen und elektronischen Kräfte, die durch die rasternde Spitze ausgeübt werden, standzuhalten. Unter Schwierigkeiten können die DNA-Moleküle elektrostatisch an die Oberflächen angeheftet werden. Selbst bei erfolgreicher Immobilisierung der DNA ist es aufgrund der extrem hohen Auflösungen, die benötigt werden, schwierig, die Baseninformationen zu unterscheiden. Mit der gegenwärtigen Technologie können Purine von Pyrimidinen unterschieden werden, die einzelnen Purine und Pyrimidine können jedoch nicht identifiziert werden. Die Fähigkeit, dieses Kunststück zu vollbringen, erfordert, daß die Elektronenmikroskopie in der Lage sein muß, zwischen Aldehyd- und Aminogruppen auf den Purinen und zwischen der An- oder Abwesenheit von Methylgruppen auf den Pyrimidine zu unterscheiden.

[0014] Die Sequenzierung mittels luminometrischem Enzymtest auf anorganisches Pyrophosphat (ELIDA) verwendet die Bestimmung der Pyrophosphat-Freisetzung bei der DNA-Polymerisation zur Feststellung der Addition von aufeinanderfolgenden Basen. Das bei der DNA-Polymerisationsreaktion freigesetzte Pyrophosphat wird durch ATP-Sulfurylase zu ATP konvertiert, und die ATP-Bildung wird kontinuierlich mittels Leuchtkäfer-Luziferase überwacht. Um die Basenspezifität zu bestimmen, verwendet das Verfahren aufeinanderfolgenden Waschungen von ATP, CTP, GTP und TTP. Wenn eine Waschung für ATP Pyrophosphat erzeugt, werden ein oder mehrere Adenine eingebaut. Die Zahl der eingebauten Basen ist direkt proportional zu der Menge des erzeugten Pyrophosphats. Die Verbesserung der erzeugten Sequenzinformationen kann durch gleichzeitige parallele Analyse von vielen ELIDA-Reaktionen erreicht werden.

[0015] Der Hauptnachteil sind die kurzen Leselängen. Ronaghi et al. (1996) haben aufgrund der vielen erforderlichen Waschungen nur eine maximale Leselänge von 15 Basen erreicht. Da es vier Waschungen pro erkannter Base gibt, bedeutet dies, daß eine Gesamtzahl von 400 Waschungen für eine Leselänge von 100 Basen durchgeführt werden muß. Wenn es nur 1% Verlust von Startmaterial bei jeder Waschung gibt, wäre nach 400 Waschungen nur 1,8% des Startmaterials übrig, was für einen Nachweis nicht ausreicht.

[0016] Exonuklease-Sequenzierung beinhaltet ein fluoreszenzmarkiertes einzelsträngiges DNA-Molekül, das in einem fließenden Strom suspendiert ist und durch eine Exonuklease nacheinander gespalten wird. Einzelne fluoreszierende Basen werden dann freigesetzt und passieren dann ein Einzelmolekül-Detektionssystem. Die zeitliche Sequenz der Detektion von markierten Nukleotiden entspricht der Sequenz der DNA (Ambrose et al., 1993; Davis et al., 1992; Jett et al., 1989). Unter Verwendung einer prozessiven Exonuklease ist es theoretisch möglich, Fragmente von 10.000 Basenpaaren oder größere Fragmente mit einer Rate von 10 Basen pro Sekunde zu sequenzieren.

[0017] In der Praxis haben sich bei der Exonuklease-Sequenzierung viele Schwierigkeiten bei jedem der Schritte ergeben. Der Markierungsschritt erfordert, daß alle vier Basen in der DNA mit verschiedenen Fluorophoren markiert sind. Sterisch ist dies extrem unvorteilhaft. Ambrose et al., 1993, haben eine vollständige Markierung von zwei Basen auf einem 7-kb-Strang M13-DNA erreicht. Zudem ist ein schwieriges "optical trapping" erforderlich, um DNA-Moleküle in einem fließenden Strom zu suspendieren. Der Schritt ist zeitintensiv und erfordert beträchtliche Fachkenntnis. Schließlich müssen einzelne Moleküle eines Fluorophors mit hoher Effizienz detektiert werden. Selbst ein Fehler von 1% ist wesentlich. Verbesserungen bei der Detektion von 65% bis 95% Effizienz sind erreicht worden. Die Effizienz der Detektion ist bis an die Grenze vorangetrieben worden und es wäre schwierig, eine weitere Verbesserung zu erreichen.

[0018] Bei der Sequenzierung durch Hybridisierungsverfahren wird eine Ziel-DNA nacheinander mit einem Satz von Oligomeren sondiert, die aus allen möglichen Oligomersequenzen bestehen. Die Sequenz der

Ziel-DNA wird durch Kenntnis der Hybridisierungsmuster zwischen den Oligomeren und der Ziel-DNA erzeugt (Bains, 1991; Cantor et al., 1992; Drmanac et al., 1994). Es gibt zwei mögliche Verfahren, Ziel-DNA zu sondieren. Das "Sonde-oben"-Verfahren beinhaltet die Immobilisierung der Ziel-DNA auf einem Substrat und das aufeinanderfolgende Sondieren mit einem Satz von Oligomeren. Das "Sonde-unten"-Verfahren erfordert auf der anderen Seite, das ein Satz von Oligomeren auf einem Substrat immobilisiert und mit der Ziel-DNA hybridisiert wird. Mit der Einführung des "DNA-Chips", der Mikrochip-Synthesetechniken auf DNA-Sonden anwendet, können Anordnungen von Tausenden verschiedener DNA-Sonden auf einer Fläche von 1 cm² erzeugt werden, was Sonde-unten-Verfahren praktikabler macht. Sonde-unten-Verfahren würden für ein 8-mer 65.536 aufeinanderfolgende Sondierungen und Waschungen erfordern, was eine enorme Menge Zeit kosten würde. Auf der anderen Seite erzeugt die Sonde-unten-Hybridisierung Daten in einigen wenigen Sekunden. Bei perfekter Hybridisierung würden 65.536 Oktamer-Sonden maximal 170 Basen bestimmen. Mit 65.536 "gemischten" 11-meren können 700 Basen erzeugt werden.

[0019] In der Praxis sind Sonde-oben-Verfahren verwendet worden, um Sequenzen von etwa 100 Basenpaaren zu erzeugen. Unvollständige Hybridisierung hat zu Schwierigkeiten bei der Erzeugung adäquater Sequenzen geführt. Der Fehler bei der Hybridisierung wird viele Male verstärkt. Eine Fehlerrate von 1% reduziert die maximale Länge, die sequenziert werden kann, um mindestens 10%. Wenn daher 1% von 65.536 Oligonukleotiden bei Hybridisierung an eine 200-mer Ziel-DNA falsch positive Hybridisierungssignale ergeben würde, wären 75% der ermittelten "Hybridisierungen" falsch (Bains, 1997). In solch einem Falle wäre die Sequenzbestimmung unmöglich. Die Schlußfolgerung ist, daß die Hybridisierung extrem effektiv sein muß, um verlässliche Daten zu erzeugen. Darüber hinaus ergeben sich bei der Sequenzierung durch Hybridisierung auch Probleme, wenn Wiederholungen in Sequenzen vorkommen, die eine Base kürzer als die Länge der Sonde sind. Wenn solche Sequenzen vorkommen, sind mehrere mögliche Sequenzen mit den Hybridisierungsdaten kompatibel.

[0020] Die gemeinsame Beschränkung der meisten dieser Techniken besteht in der kurzen Leselänge. In der Praxis bedeutet eine kurze Leselänge, daß zusätzliche Gensequenzinformation sequenziert werden muß, bevor die Reihenfolge einer Ziel-DNA entziffert werden kann. Die kurzen Fragmente müssen mit zusätzlichen überlappenden Fragmenten überbrückt werden. Theoretisch müssen bei einer Leselänge von 500 Basen mindestens 9×10^9 Basen sequenziert werden, bevor die lineare Sequenz aller 3×10^9 Basen des menschlichen Genoms korrekt geordnet sind. In der Realität beträgt die Anzahl der Basen, die erforderlich sind, um ein glaubwürdiges Genom zu erzeugen, ungefähr 2×10^{10} Basen. Der Vergleich der verschiedenen Techniken zeigt, daß nur die unpraktikable Exonuklease-Sequenzierung die theoretische Fähigkeit langer Leselängen aufweist. Die anderen Verfahren haben kurze theoretische Leselängen und noch kürzere reale Leselängen. Um die Anzahl von Basen, die sequenziert werden müssen, zu reduzieren, ist es klar, daß die Leselänge verbessert werden muß.

[0021] Die Proteinsequenzierung beinhaltet im allgemeinen die chemisch induzierte sequentielle Entfernung und Identifizierung des terminalen Aminosäurerestes, z. B. durch Edman-Abbau, siehe Stryer. L., Biochemistry, W. H. Freeman and Co., San Francisco (1981) S. 24–27. Edman-Abbau erfordert, daß das Polypeptid eine freie Aminogruppe aufweist, die mit einem Isothiocyanat in Reaktion gebracht ist. Das Isothiocyanat ist typischerweise Phenylisothiocyanat. Das Addukt reagiert intramolekular mit der nächsten Rückgrat-Amidgruppe des Polymers, wobei ein fünfgliedriger Ring gebildet wird. Dieses Addukt gruppiert sich um und der terminale Aminosäurereste wird dann unter Verwendung von starker Säure abgespalten. Das freigesetzte Phenylthiohydantoin (PTH) der Aminosäure wird identifiziert und das gekürzte Polymer kann wiederholten Zyklen von Abbau und Analyse unterzogen werden.

[0022] Ferner sind verschiedene neue Verfahren zur carboxyterminalen Sequenzierung von Polypeptiden beschrieben worden. Siehe Inglis, A. S., Anal. Biochem. 195: 183–96 (1991). Carboxyterminale Sequenzierungsverfahren ahmen den Edman-Abbau nach, beinhalten aber einen sequentiellen Abbau vom anderen Ende des Polymers. Siehe See Inglis, A. S., Anal. Biochem. 195: 183–96 (1991). Wie der Edman-Abbau beinhalten die carboxyterminalen Sequenzierungsverfahren die chemisch induzierte Entfernung und Identifikation des terminalen Aminosäurerestes.

[0023] Vor kurzem ist eine Polypeptid-Sequenzierung durch Herstellung eines verschachtelten Satzes (sequenzdefinierenden Satzes) von Polymerfragmenten mit anschließender Massenanalyse beschrieben worden. Siehe See Chait, B. T. et al., Science 257: 1885–94 (1992). Die Sequenz wird durch Vergleichen der relativen Massendifferenzen zwischen Fragmenten mit den bekannten Massen der Aminosäurereste bestimmt. Obwohl die Bildung eines verschachtelten (sequenzdefinierenden) Satzes von Polymerfragmenten ein Erfordernis der DNA-Sequenzierung ist, unterscheidet sich dieses Verfahren wesentlich von den konventionellen Protein-Sequenzierungsverfahren, die auf der sequentiellen Entfernung und Identifikation jedes Restes beru-

hen. Obwohl dieses Verfahren viele Möglichkeiten in der Praxis eröffnet, ist es auf mehrere Probleme gestoßen und hat sich nicht als wirksames Verfahren herausgestellt.

[0024] Die WO-A-96/30508 offenbart ein Verfahren zur Sequenzierung von Polynukleotiden, das darauf beruht, ein Ziel-Polynukleotid entlang einer festen Röhre gleiten zu lassen, die eine Sperre aufweist. Diese Sperre wird hergestellt durch Gleitenlassen eines zweiten mit einem ersten Fluorochrom markierten linearen Moleküls entlang einer zweiten Röhrenstruktur, die senkrecht angeordnet ist und ein starres Molekül an der Innenwand angeheftet aufweist, das mit einem zweiten Fluorochrom markiert ist und mit dem linearen Molekül wechselwirkt.

[0025] Jedes der bekannten Verfahren zur Sequenzierung von Polymeren hat Nachteile. Beispielsweise sind die meisten der Verfahren langsam und arbeitsaufwendig. Die gelbasierten DNA-Sequenzierungsverfahren erfordern ungefähr 1 bis 3 Tage zur Identifizierung der Sequenz von 300–800 Einheiten eines Polymers. Verfahren wie Massenspektroskopie und ELIDA-Sequenzierung können nur bei sehr kurzen Polymeren durchgeführt werden.

[0026] Es existiert ein enormer Bedarf für eine neue Polymer-Sequenzbestimmung. Die Sequenzierungsrate hat die Möglichkeit, viele Körper- und zeitliche Expressionskarten anzulegen, limitiert, die die schnelle Feststellung der komplexen genetischen Funktion zweifellos fördern würden. Ein Bedarf besteht auch für verbesserte Verfahren zur Analyse von Polymeren, um die Geschwindigkeit zu erhöhen, mit der die Diagnose von Krankheiten und die Herstellung neuer Medikamente durchgeführt wird.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

[0027] Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Analyse von Polymeren und insbesondere neue Verfahren, die geeignet sind, Sequenzen von Polymeren, wie in den angefügten Ansprüchen definiert, zu bestimmen. Die Erfindung hat überraschende Vorteile gegenüber den Verfahren nach dem Stand der Technik, die zur Sequenzierung von Polymeren verwendet wurden. Vor der vorliegenden Erfindung ist kein Verfahren oder keine Kombination von Verfahren an die Sequenzierungsgeschwindigkeit, die die vorliegende Erfindung erreichen kann, herangekommen. Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Verfahren kann das vollständige menschliche Genom um einige Größenordnungen schneller sequenziert werden, als dies bei Verwendung konventioneller Techniken möglich wäre. Über die Sequenzierung des vollständigen Genoms hinaus, kann das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden, um umfassende und viele Expressionskarten für Entwicklungs- und Krankheitsprozesse zu erzeugen. Die Möglichkeit, das Genom eines Individuums zu sequenzieren und viele Expressionskarten zu erzeugen, wird die Möglichkeit, die genetische Grundlage irgendeines phänotypischen Merkmals oder Krankheitsprozesses festzustellen, stark verbessern.

[0028] Das Verfahren zur Analyse von Polymeren gemäß der Erfindung beruht auf der Fähigkeit, jede Einheit eines Polymers einzeln zu untersuchen. Dadurch, daß jede Einheit individuell untersucht wird, kann die Art der Einheit und die Position der Einheit im Rückgrat des Polymers identifiziert werden. Dies kann erreicht werden durch Anordnen einer Einheit an einer Station und Untersuchen einer Änderung, die auftritt, wenn diese Einheit sich in der Nähe dieser Station befindet. Die Änderung kann sich ergeben als Ergebnis einer Wechselwirkung, die auftritt zwischen der Einheit und der Station oder einem Partner, und ist für die jeweilige Einheit spezifisch. Wenn das Polymer beispielsweise ein Nukleinsäuremolekül ist und ein T in der Nähe der Station angeordnet ist, tritt einer Änderung auf, die spezifisch für ein T ist. Wenn auf der anderen Seite ein G in der Nähe zu einer Station angeordnet ist, wird eine Änderung auftreten, die spezifisch für ein G ist. Die auftretende spezifische Änderung hängt von der verwendeten Station und der Art des untersuchten Polymers ab. Beispielsweise kann die Änderung ein elektromagnetisches Signal sein, daß in der Folge einer Wechselwirkung entsteht.

[0029] Die erfindungsgemäßen Verfahren umfassen im großen und ganzen zwei Arten von Verfahren zur Analyse von Polymeren durch Identifizieren einer Einheit (oder in einigen Fällen einer Gruppe von Einheiten) innerhalb eines Polymers. Die erste Art Verfahren beinhaltet die Analyse von mindestens einem einzelnen Polymer. Eine individuelle Einheit des einzelnen Polymers wird nach einem Aspekt in Wechselwirkung mit einem Mittel gebracht, so daß eine Änderung, z. B. ein Energietransfer oder eine Dämpfung (ein "Quenching") auftritt und ein Signal erzeugt. Das Signal weist auf die Identität der Einheit hin. Nach einem anderen Aspekt wird eine individuelle Einheit einer Station gegenüber ausgesetzt, was zu einer physikalischen Änderung bei der Einheit oder der Station führt. Die Änderung in der Einheit oder der Station erzeugt ein Signal, das festgestellt werden kann und kennzeichnend für diese bestimmte Einheit ist. Die zweite Art von Verfahren beinhaltet die Analyse einer Mehrzahl von Polymeren. Eine Einheit von jedem der Mehrzahl von Polymeren wird an einer Station angeordnet, wo eine Wechselwirkung auftreten kann. Die Wechselwirkung ist eine, die einen polymerabhängigen

Impuls erzeugt, der die Einheit spezifisch identifiziert. Der polymerabhängige Impuls kann beispielsweise aus Energietransfer, Dämpfung, Leitfähigkeitsänderungen, mechanischen Änderungen, Widerstandsänderungen oder jeder anderen physikalischen Änderung entstehen.

[0030] Das vorgeschlagene Verfahren zur Analyse von Polymeren ist besonders geeignet zur Feststellung der Sequenz von Einheiten innerhalb eines DNA-Moleküls und kann den Bedarf für die Erzeugung genomischer Bibliotheken, das Klonieren und Kolonie-Picken eliminieren, die allesamt langwierige Vor-Sequenzierungsschritte bilden, die die gegenwärtigen Sequenzierungsverfahren im Genom-Maßstab limitieren. Die hier offenbarten Verfahren stellen viel längere Leselängen bereit, als diese nach dem Stand der Technik erreicht werden können, und eine millionenfach schnellere Sequenzlesung. Die vorgeschlagene Leselänge liegt in der Größenordnung von mehreren hunderttausend Nukleotiden. Dies führt zu einem signifikant niedrigeren Bedarf an überlappenden oder redundanten Sequenzen, wodurch die tatsächliche Menge von DNA, die vor der Rekonstruktion des Genoms sequenziert werden muß, vermindert wird.

[0031] Verfahren zur Herstellung von Polymeren für die Analyse werden hier ebenfalls beansprucht. Die Kombination aus der langen Leselänge und den neuen Herstellungsverfahren führt zu einem sehr viel rationelleren und effizienteren Verfahren. Schließlich ist die tatsächliche Zeit, die erforderlich ist, um eine gegebene Zahl von Einheiten eines Polymers zu lesen, aufgrund der enormen parallelen Amplifikation, die durch die neuartige Vorrichtung, die hier ebenfalls beansprucht wird, bereitgestellt wird, und die als eine Nanokanalplatte oder eine Mikrokanalplatte bezeichnet wird, millionenfach schneller als bei bestehenden Verfahren. Die Kombination all dieser Faktoren führt zu einem Verfahren der Polymeranalyse, einschließlich der Sequenzierung, die enorme Vorteile auf dem Gebiet der Molekular- und Zellbiologie bereitstellt.

[0032] Die Fähigkeit, Polymere, wie beispielsweise genomische DNA, durch die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Verfahren zu sequenzieren, wird enorme Auswirkungen in der biomedizinischen Wissenschaft haben. Die Gewinnung von genetischen Daten in solch rascher Geschwindigkeit wird das Humangenomprojekt vorantreiben. Die erfindungsgemäßen Verfahren und Produkte werden die Fähigkeit ermöglichen, mehrere Expressionskarten für jedes Individuum herzustellen, was es möglich macht, vollständige genetische Programme beim Menschen zu entziffern. Die Möglichkeit, Pools individueller genetische Daten zu einer bestimmten Zeit zu vergleichen, ermöglicht es erstmals, nicht nur durch einzelne Gene verursachte Krankheiten leicht zu entdecken, sondern auch komplexe multigen verursachte Fehlfunktionen genauso schnell zu entdecken wie die DNA selbst sequenziert wird.

[0033] In einem Aspekt ist die Erfindung ein Verfahren zur Analyse eines Polymers aus verbundenen Einheiten. Das Verfahren beinhaltet die Schritte des Aussetzens mehrerer individueller Einheiten eines Polymers einem Mittel gegenüber, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle, wobei die individuellen Einheiten mit dem Mittel zur Erzeugung eines detektierbaren Signals wechselwirken, und des sequentiellen Detektierens der Signale, die aus der Wechselwirkung resultieren, zur Analyse des Polymers. In einer Ausführungsform ist das Signal elektromagnetische Strahlung. In einer anderen Ausführungsform ist das Mittel elektromagnetische Strahlung. Nach einer erfindungsgemäßen Ausführungsform sind individuelle Einheiten des Polymers mit einem Fluorophor markiert.

[0034] Die mehreren individuellen Einheiten des Polymers können nacheinander elektromagnetischer Strahlung ausgesetzt werden, indem die mehreren individuellen Einheiten in die Nähe einer lichtemittierenden Verbindung gebracht werden und die lichtemittierende Verbindung elektromagnetischer Strahlung gegenüber ausgesetzt wird, und wobei die Mehrzahl der individuellen Einheiten des Polymers die Emission elektromagnetischer Strahlung von der lichtemittierenden Verbindung beeinträchtigt. In einer anderen Ausführungsform werden die mehreren individuellen Einheiten des Polymers zur Erzeugung des detektierbaren Signals nacheinander elektromagnetischer Strahlung gegenüber ausgesetzt, wobei die elektromagnetische Strahlung die Emission von elektromagnetischer Strahlung von den mehreren individuellen Einheiten des Polymers detektierbar beeinträchtigt.

[0035] Nach einer anderen Ausführungsform der Erfindung beinhaltet das Verfahren den Schritt des Bewegens des Polymers durch einen Nanokanal in einem Wandmaterial, um das detektierbare Signal zu lokalisieren. Die mehreren individuellen Einheiten des Polymers werden nacheinander dem Mittel gegenüber ausgesetzt, indem das Polymer durch einen Nanokanal in einem Wandmaterial bewegt wird und die mehreren individuellen Einheiten des Polymers dem Mittel gegenüber an einer Wechselwirkungsstation an dem Nanokanal ausgesetzt werden. Das Mittel kann an das Wandmaterial angeheftet (darin eingebettet, kovalent an dessen Oberfläche gebunden oder auf dessen Oberfläche geschichtet) sein. In einer Ausführungsform beinhaltet das

Wandmaterial eine Mehrzahl von Nanokanälen, eine Wechselwirkungsstation an jedem Nanokanal, und eine Mehrzahl von Polymeren wird durch den Nanokanal bewegt, wobei nur ein Polymer die Wechselwirkungsstation zu einer bestimmten Zeit passiert (in einem einzelnen Nanokanal kann zu einer gegebenen Zeit mehr als ein Polymer vorhanden sein, solange sie nicht überlappen), und Signale, die aus der Wechselwirkung zwischen individuellen Einheiten des Polymers und dem Mittel an den Wechselwirkungsstationen erhalten werden, werden gleichzeitig detektiert. Vorzugsweise ist der Nanokanal in dem Wandmaterial fixiert.

[0036] Die detektierten Signale können in einer Datenbank für die weitere Analyse gespeichert werden. In einem Analyseverfahren können diese Signale mit einem Muster von Signalen von anderen Polymeren verglichen werden, um die Verwandtschaft der zwei Polymere zu bestimmen. Alternativ können die detektierten Signale mit einem bekannten Muster von Signalen verglichen werden, das für ein bekanntes Polymer kennzeichnend ist, um die Verwandtschaft des analysierten Polymers mit dem bekannten Polymer zu bestimmen. Die Analyse kann auch das Messen der Zeitspanne, die zwischen der Detektion eines ersten Signals von der ersten Einheit und einem zweiten Signale von einer zweiten Einheit vergangen ist, beinhalten. In einer zweiten Ausführungsform sind die mehreren individuellen Einheiten zwei Einheiten, eine erste Einheit an einem ersten Ende des Polymers und eine zweite Einheit an einem entgegengesetzten zweiten Ende des Polymers. Die Zeit, die zwischen der aufeinanderfolgenden Detektion von Signalen vergangen ist, kann auf die Distanz zwischen zwei Einheiten oder die Länge des Polymers hinweisen.

[0037] Das Polymer kann jede Art von Polymer sein, das in der Fachwelt bekannt ist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Polymer ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einer Nukleinsäure und einem Protein. In einer weiter bevorzugten Ausführungsform ist das Polymer eine Nukleinsäure.

[0038] Die Einheiten des Polymers, die mit dem Mittel zur Erzeugung eines Signals wechselwirken, sind markiert. Die Einheiten können intrinsisch oder extrinsisch markiert sein. In einer bevorzugten Ausführungsform ist nur ein Teil der Einheiten des Polymers markiert. In einer anderen Ausführungsform sind alle Einheiten markiert. In noch einer anderen Ausführungsform sind mindestens zwei Einheiten des Polymers verschieden markiert, um zwei verschiedene detektierbare Signale zu erzeugen. Die Einheiten des Polymers können derart markiert sein, daß jede Einheit oder ein bestimmter Anteil der Einheiten markiert ist, oder es kann zufallsmarkiert sein.

[0039] In einer anderen Ausführungsform werden die mehreren individuellen Einheiten des Polymers mindestens zwei Stationen gegenüber ausgesetzt, die in bestimmten Bereichen des Kanals angeordnet sind, wobei die Wechselwirkung zwischen den Einheiten des Polymers und den mindestens zwei Stationen mindestens zwei Signale erzeugt.

[0040] In einer Ausführungsform ist die individuelle Einheit des Polymers mit Strahlung markiert und das Signal ist elektromagnetische Strahlung in Form von Fluoreszenz.

[0041] In einer anderen Ausführungsform wird die Einheit dem Mittel gegenüber an einer Station ausgesetzt. Vorzugsweise ist die Station ein nichtflüssiges Material.

[0042] In noch einer anderen Ausführungsform werden die mehreren individuellen Einheiten des Polymers mindestens zwei Mitteln gegenüber ausgesetzt und die Wechselwirkung zwischen den Einheiten des Polymers und den mindestens zwei Mitteln erzeugt mindestens zwei Signale. Die mindestens zwei Mittel können in bestimmten Bereichen eines Kanals angeordnet sein, den das Polymer passiert. In einer Ausführungsform sind die mindestens zwei Signale verschiedene Signale. In einer anderen Ausführungsform sind die mindestens zwei Signale dieselben Signale.

[0043] Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Analyse eines Polymers aus verbundenen Einheiten bereitgestellt. Das Verfahren beinhaltet die Schritte des Bewegens von mehreren individuellen Einheiten eines Polymers aus verbundenen Einheiten in Bezug auf eine Station und des Detektierens aufeinanderfolgender Signale, die aus einer detektierbaren physikalischen Änderung in dem Polymer oder der Station entstehen, wenn individuelle Einheiten die Station zur Analyse des Polymers passieren. Dieser Aspekt der Erfindung umfaßt auch jede der oben beschriebenen Ausführungsformen.

[0044] In einer Ausführungsform ist die Station eine Wechselwirkungsstation und die individuellen Einheiten werden an der Wechselwirkungsstation einem Mittel gegenüber ausgesetzt, das mit den individuellen Einheiten zur Erzeugung eines detektierbaren Signals aus elektromagnetischer Strahlung wechselwirkt, das für die Wechselwirkung charakteristisch ist. In einer anderen Ausführungsform ist die Station eine Signalerzeugungs-

station und das hervorgerufene charakteristische Signal ist ein polymerabhängiger Impuls. Vorzugsweise ist die Station ein nichtflüssiges Material.

[0045] In einem anderen Aspekt ist die Erfindung ein Verfahren zur Analyse eines Polymers von verbundenen Einheiten durch Exponieren von mehreren individuellen Einheiten eines Polymers einer Station gegenüber zur Erzeugung eines Nichtionenleitungssignal, das aus der Exponierung der Einheiten des Polymers der Station gegenüber resultiert, und wobei die Station an ein Wandmaterial angeheftet ist, das eine einen Kanal ausbildende Oberfläche aufweist. Dieser Aspekt der Erfindung umfaßt auch jede der oben beschriebenen Ausführungsformen.

[0046] Nach einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Identifizierung einer individuellen Einheit eines Polymers bereitgestellt. Das Verfahren beinhaltet die Schritte des vorübergehenden Exponierens der individuellen Einheit des Polymers einem Mittel gegenüber, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle, wobei die Identität der individuellen Einheit unbekannt ist, um eine Wechselwirkung mit einem detektierbaren Signale aus elektromagnetischer Strahlung zu erzeugen, das charakteristisch für die individuelle Einheit ist, des Detektierens des Signals und des Unterscheidens des Signals von Signalen, die von benachbarten signalerzeugenden Einheiten des Polymers erzeugt werden, als Hinweis auf die Identität der individuellen Einheit.

[0047] Das Mittel kann ein oder mehrere Fluorophore sein und ist bevorzugt mindestens drei Fluorophore. Wenn die individuelle Einheit vorübergehend einem oder mehreren Fluorophoren (Mittel) durch Anordnen der individuellen Einheit innerhalb von Energietransfernähe zu dem Mittel ausgesetzt wird, tritt ein Fluoreszenzenergietransfer zwischen dem Mittel und der individuellen Einheit auf. Das Signal wird durch Detektion des Fluoreszenzenergietransfers detektiert.

[0048] In einer Ausführungsform wird die individuelle Einheit des Polymers dem Mittel gegenüber durch Anordnen der individuellen Einheit an einer Wechselwirkungsstation, die einen Nanokanal in einem Wandmaterial umfaßt, gegenüber ausgesetzt. Bevorzugt umfaßt das Wandmaterial mindestens zwei Schichten, wobei eine der Schichten die Signalerzeugung ermöglicht und die andere die Signalerzeugung verhindert und wobei der Nanokanal beide Schichten durchzieht.

[0049] Nach einem anderen Aspekt ist die Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung einer individuellen Einheit eines Polymers. Das Verfahren beinhaltet die Schritte des vorübergehenden Bewegens der individuellen Einheit des Polymers relativ zu einer Station, wobei die Identität der individuellen Einheit unbekannt ist, des Detektierens eines Signals, das bei der detektierbaren physikalischen Änderung in der Einheit oder der Station entsteht, und des Unterscheidens des Signals von Signalen, die bei der Exposition von benachbarten signalerzeugenden Einheiten des Polymers der Station gegenüber entstehen, als Hinweis auf die Identität der individuellen Einheit. Dieser Aspekt der Erfindung umfaßt auch jede der oben beschriebenen Ausführungsformen.

[0050] In einer Ausführungsform ist die Station eine Wechselwirkungsstation und die individuellen Einheiten werden an der Wechselwirkungsstation einem Mittel gegenüberausgesetzt, das mit der individuellen Einheit zur Erzeugung eines detektierbaren Signals aus elektromagnetischer Strahlung wechselwirkt, das für die Wechselwirkung charakteristisch ist. In einer anderen Ausführungsform ist die Station eine Signalerzeugungsstation und das erzeugte charakteristische Signal ist ein polymerabhängiger Impuls.

[0051] Nach noch einem anderen Aspekt ist die Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung der Nähe von zwei individuellen Einheiten eines Polymers aus verbundenen Einheiten. Das Verfahren beinhaltet die Schritte des Bewegens des Polymers relativ zu einer Station, des Aussetzens individueller Einheiten der Station gegenüber, um ein charakteristisches Signal zu erzeugen, das bei der detektierbaren physikalischen Änderung in der Einheit oder der Station entsteht, des Detektierens charakteristischer erzeugter Signale und des Messens der zwischen charakteristischen Signalen vergangenen Zeit, wobei die vergangene Zeit auf die Nähe der zwei Einheiten hinweist.

[0052] In einer Ausführungsform ist die Station eine Wechselwirkungsstation. In einer anderen Ausführungsform beinhaltet die Wechselwirkungsstation ein Mittel, und das Mittel ist ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle, und das charakteristische Signal ist ein detektierbares Signal aus elektromagnetischer Strahlung. In einer anderen Ausführungsform ist die Wechselwirkungsstation ein Nanokanal in einem Wandmaterial.

[0053] In bestimmten anderen Ausführungsformen ist die betreffende Station eine Signalerzeugungsstation.

In einer anderen Ausführungsform beinhaltet die Signalerzeugungsstation eine Quelle eines physikalischer Impulses, der mit dem Polymer wechselwirkt, um ein charakteristisches Signal zu erzeugen, das ein physikalischer Impuls ist. In einer Ausführungsform entsteht der physikalische Impuls bei einer Änderung in einer physikalischen Größe wie beispielsweise dem Widerstand oder der Leitfähigkeit als Ergebnis der Exposition der Quelle eines physikalischen Impulses der Einheit des Polymers gegenüber. In einer anderen Ausführungsform entsteht der physikalische Impuls aus Änderungen in der Kapazität oder dem Widerstand in der Folge der Bewegung der Einheit zwischen Mikroelektroden oder Nanoelektroden, die zu der Polymereinheit benachbart angeordnet sind. Die Signalerzeugungsstation kann beispielsweise Mikroelektroden oder Nanoelektroden beinhalten, die an gegenüberliegenden Seiten der Polymereinheit angeordnet sind. Die Änderungen im Widerstand oder der Leitfähigkeit, die als Ergebnis der Bewegung der Einheit an den Elektroden vorbei auftreten, werden für die jeweilige Einheit spezifisch sein. In anderen Ausführungsformen entsteht der physikalische Impuls aus der Freisetzung eines radioaktiven Signals von der Einheit. In anderen Ausführungsformen entsteht es aus einer piezoelektrischen Spitze, direktem physikalischen Kontakt und einem NMR-Kernspinsignal.

[0054] Das Polymer kann jede Art Polymer sein, die im Stand der Technik bekannt ist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Polymer ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einer Nukleinsäure und einem Protein. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Polymer eine Nukleinsäure. Die Polymere können markiert sein, zufalls- oder nicht zufallsmarkiert. Verschiedene Marker können verwendet werden, um verschiedene verbundenen Einheiten zu markieren und verschiedene Signale zu erzeugen. In einer Ausführungsform sind die individuellen Einheiten des Polymers mit einem Fluorophor markiert.

[0055] Nach einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Bestimmung der Reihenfolge von zwei individuellen Einheiten eines Polymers aus verbundenen Einheiten bereitgestellt. Das Verfahren beinhaltet die Schritte des Bewegens des Polymers linear in Bezug auf eine Station, des Aussetzens einer der individuellen Einheiten der Station gegenüber, um ein Signal zu erzeugen, das bei der detektierbaren physikalischen Änderung in der Einheit oder der Station entsteht, des Aussetzens der anderen der individuellen Einheiten der Station gegenüber, um ein zweites, von dem ersten Signal verschiedenes, detektierbares Signal zu erzeugen, das bei einer detektierbaren physikalischen Änderung in der Einheit oder der Station entsteht, und des Bestimmens der Reihenfolge der Signale als Hinweis auf die Reihenfolge der zwei individuellen Einheiten.

[0056] In einer Ausführungsform ist die Station eine Wechselwirkungsstation. In einer anderen Ausführungsform beinhaltet die Wechselwirkungsstation ein Mittel, und das Mittel ist ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle, und die erzeugten charakteristischen Signale sind detektierbare Signale elektromagnetischer Strahlung. In einer anderen Ausführungsform ist die Wechselwirkungsstation ein Nanokanal in einem Wandmaterial.

[0057] In bestimmten anderen Ausführungsformen ist die betreffende Station eine Signalerzeugungsstation. In einer anderen Ausführungsform beinhaltet die Signalerzeugungsstation eine Quelle eines physikalischen Impulses, der mit dem Polymer wechselwirkt, um ein charakteristisches Signal zu erzeugen, das ein physikalischer Impuls ist. In einer Ausführungsform entsteht der physikalische Impuls bei einer Änderung in einer physikalischen Größe wie beispielsweise dem Widerstand oder der Leitfähigkeit als Ergebnis der Exposition der Quelle eines physikalischen Impulses der Einheit des Polymers gegenüber. In einer anderen Ausführungsform entsteht der physikalische Impuls aus Änderungen in der Kapazität oder dem Widerstand in der Folge der Bewegung der Einheit zwischen Mikroelektroden oder Nanoelektroden, die zu der Polymereinheit benachbart angeordnet sind. Die Signalerzeugungsstation kann beispielsweise Mikroelektroden oder Nanoelektroden beinhalten, die an gegenüberliegenden Seiten der Polymereinheit angeordnet sind. Die Änderungen im Widerstand oder der Leitfähigkeit, die als Ergebnis der Bewegung der Einheit an den E-Elektroden vorbei auftreten, werden für die jeweilige Einheit spezifisch sein. In einer anderen Ausführungsform entsteht der physikalische Impuls aus der Freisetzung eines radioaktiven Signals von der Einheit. In anderen Ausführungsformen entsteht es aus einer piezoelektrischen Spitze, direktem physikalischen Kontakt und einem NMR-Kernspinsignal.

[0058] Das Polymer kann jede Art Polymer sein, die im Stand der Technik bekannt ist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Polymer ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einer Nukleinsäure und einem Protein. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Polymer eine Nukleinsäure. Die Polymere können markiert sein, zufalls- oder nicht zufallsmarkiert. Verschiedene Marker können verwendet werden, um verschiedene verbundenen Einheiten zu markieren und verschiedene Signale zu erzeugen. In einer Ausführungsform sind die individuellen Einheiten des Polymers mit einem Fluorophor markiert. In einer anderen Ausführungsform sind die individuellen Einheiten des Polymers mit Radioaktivität markiert.

[0059] Nach noch einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Bestimmung des Abstands zwi-

schen zwei individuellen Einheiten eines Polymers aus verbundenen Einheiten bereitgestellt. Das Verfahren beinhaltet die Schritte des Veranlassens, daß das Polymer relativ zu einer Station passiert, des Detektierens eines charakteristischen Signals, das erzeugt wird, wenn jedes der zwei individuellen Einheiten die Station passiert, des Messens der zwischen den gemessenen Signalen vergangenen Zeit, des Wiederholens der Schritte 1, 2 und 3 für eine Mehrzahl ähnlicher Polymere zur Erzeugung eines Datensatzes, und der Bestimmung des Abstands zwischen den zwei individuellen Einheiten auf Grundlage der Information, die zu der Mehrzahl von ähnlichen Polymeren erhalten wurde, durch Analyse des Datensatzes.

[0060] In einer Ausführungsform ist die Station eine Wechselwirkungsstation. In einer anderen Ausführungsform beinhaltet die Wechselwirkungsstation ein Mittel, und das Mittel ist ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle. In einer anderen Ausführungsform sind die erzeugten charakteristischen Signale detektierbare Signale elektromagnetischer Strahlung. In einer anderen Ausführungsform ist die Wechselwirkungsstation ein Nanokanal in einem Wandmaterial.

[0061] In bestimmten anderen Ausführungsformen ist die betreffende Station eine Signalerzeugungsstation. In einer anderen Ausführungsform beinhaltet die Signalerzeugungsstation eine Quelle eines physikalischen Impulses, der mit dem Polymer wechselwirkt, um ein charakteristisches Signal zu erzeugen, das ein physikalischer Impuls ist. In einer Ausführungsform entsteht der physikalische Impuls bei einer Änderung in einer physikalischen Größe wie beispielsweise dem Widerstand oder der Leitfähigkeit als Ergebnis der Exposition der Quelle eines physikalischen Impulses der Einheit des Polymers gegenüber. In einer anderen Ausführungsform entsteht der physikalische Impuls aus Änderungen in der Kapazität oder dem Widerstand in der Folge der Bewegung der Einheit zwischen Mikroelektroden oder Nanoelektroden, die zu der Polymereinheit benachbart angeordnet sind. Die Signalerzeugungsstation kann beispielsweise Mikroelektroden oder Nanoelektroden beinhalten, die an gegenüberliegenden Seiten der Polymereinheit angeordnet sind. Die Änderungen im Widerstand oder der Leitfähigkeit, die als Ergebnis der Bewegung der Einheit an den E-Elektroden vorbei auftreten, werden für die jeweilige Einheit spezifisch sein. In einer anderen Ausführungsform werden die zwei verbundenen Einheiten an der Signalerzeugungsstation durch Messung der Lichtemission an der Station detektiert. In einer anderen Ausführungsform entsteht der physikalische Impuls aus der Freisetzung eines radioaktiven Signals von der Einheit. In anderen Ausführungsformen entsteht es aus einer piezoelektrischen Spitze, direktem physikalischen Kontakt und einem NMR-Kernspinsignal.

[0062] Das Polymer kann jede Art Polymer sein, die im Stand der Technik bekannt ist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Polymer ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einer Nukleinsäure und einem Protein. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Polymer eine Nukleinsäure. Die Polymere können markiert sein, zufalls- oder nicht zufallsmarkiert. Verschiedene Marker können verwendet werden, um verschiedene verbundenen Einheiten zu markieren und verschiedene Signale zu erzeugen. In einer Ausführungsform sind die individuellen Einheiten des Polymers mit einem Fluorophor markiert.

[0063] In einer anderen Ausführungsform ist die Mehrzahl ähnlicher Polymere eine homogene Population. In einer anderen Ausführungsform ist die Mehrzahl ähnlicher Polymere eine heterogene Population.

[0064] In einer anderen Ausführungsform werden die Schritte (1)–(4) im wesentlichen gleichzeitig ausgeführt.

[0065] Nach noch einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Detektion des Resonanzenergietransfers oder der Dämpfung zwischen zwei wechselwirkenden Partnern, die zu einem solchen Transfer oder einer solchen Dämpfung fähig sind, offenbart. Das Verfahren beinhaltet die Schritte des Bringens der beiden Partner in eine ausreichende Nähe, um einen solchen Transfer oder einer solche Dämpfung zu ermöglichen, Anwendens eines Mittels auf einen der Partner, wobei das Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle, des Abschirmens von Fluoreszenzresonanzenergietransfer und Dämpfung, die bei der Emission elektromagnetischer Strahlung auftreten, und der Wechselwirkung zwischen den Partnern mit einem Materialschild, und Detektierens der emittierten elektromagnetischer Strahlung. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist der Materialschild ein leitfähiger Materialschild.

[0066] Nach einem anderen Aspekt ist die Erfindung ein Verfahren zur Analyse eines Polymers aus verbundenen Einheiten. Das Verfahren beinhaltet die Schritte des Bereitstellens eines markierten Polymers aus verbundenen Einheiten, des Detektierens von Signalen von einheitsspezifischen Markern von weniger als allen der verbundenen Einheiten, und des Speicherns einer Signatur der detektierten Signale zur Analyse des Polymers. In einer Ausführungsform werden alle einheitsspezifischen Marker detektiert. In einer anderen Ausführungsform werden nur einige einheitsspezifische Marker detektiert.

rungsform ist das Polymer mit einheitsspezifischen Markern teilweise oder zufallsmarkiert. In noch einer anderen Ausführungsform wird lediglich ein Teil der einheitsspezifischen Marker detektiert. Bei einer anderen Ausführungsform sind alle Einheiten des Polymers mit einem einheitsspezifischen Marker markiert.

[0067] In einer Ausführungsform wird das markierte Polymer aus verbundenen Einheiten einem Mittel gegenüberausgesetzt, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle, und die Signale werden durch Wechselwirkung zwischen einem einheitsspezifischen Marker des Polymers und dem Mittel hervorrufen.

[0068] In einer Ausführungsform werden die Signale linear detektiert. In einer anderen Ausführungsform beinhaltet die Signatur aus Signalen mindestens 10 Signale, und bevorzugt 20 Signale. Die Signatur aus Signalen beinhaltet jede Information über das Polymer. Vorzugsweise beinhaltet die Signatur aus Signalen Informationen über die Reihenfolge, den Abstand und die Anzahl von einheitsspezifischen Markern.

[0069] In einer anderen Ausführungsform wird das markierte Polymer aus verbundenen Einheiten in Bezug auf eine Station bewegt, wobei die Signale bei Exposition eines spezifischen Markers des Polymers der Station gegenüber erzeugt werden. Die Station kann eine Wechselwirkungsstation sein.

[0070] In einigen Ausführungsformen ist das Verfahren ein Verfahren zur Identifizierung eines einheitsspezifischen Markers des Polymers, wobei die Identität des einheitsspezifischen Markers auf die Identität von mindestens einer Einheit des Polymers hinweist. Der einheitsspezifische Marker wird vorübergehend einer Station gegenüber ausgesetzt, um Signale zu produzieren, die für den einheitsspezifischen Marker charakteristisch sind, und das Signal wird von Signalen unterschieden, die von benachbarten signalerzeugenden einheitsspezifischen Markern des Polymers erzeugt werden, als Hinweis auf die Identität des einheitsspezifischen Markers. Die Station kann eine Wechselwirkungsstation sein, beinhaltend ein Mittel, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle, wobei die Signale detektierbare Signale elektromagnetischer Strahlung sind.

[0071] In anderen Ausführungsformen ist das Verfahren ein Verfahren zur Bestimmung der Nähe von zwei einheitsspezifischen Markern des Polymers, wobei die Nähe der zwei einheitsspezifischen Marker die Signatur des Signals ist, und wobei die Identität jedes einheitsspezifischen Markers auf die Identität von mindestens einer Einheit des Polymers hinweist. Das markierte Polymer wird relativ zu einer Station bewegt, um die zwei einheitsspezifischen Marker der Station gegenüber auszusetzen, um ein charakteristisches Signal zu erzeugen, das bei einer detektierbaren physikalischen Änderung in dem einheitsspezifischen Marker oder der Station entsteht, und die zwischen der Detektion jedes charakteristischen Signals vergangene Zeit wird gemessen, wobei die vergangene Zeit auf die Nähe der zwei einheitsspezifischen Marker hinweist.

[0072] Das Verfahren kann auch ein Verfahren sein zur Bestimmung der Reihenfolge von zwei einheitsspezifischen Markern des Polymers, wobei die Identität jedes einheitsspezifischen Markers auf die Identität mindestens einer Einheit des Polymers hinweist, und wobei die Reihenfolge der zwei einheitsspezifischen Marker die Signatur der Signale bildet. Das markierte Polymer wird linear bezüglich einer Station bewegt, um einen der einheitsspezifischen Marker der Station gegenüber auszusetzen und ein Signal zu erzeugen, das ein einheitsspezifischer Marker ist, und um den anderen der einheitsspezifischen Marker der Station gegenüber zu exponieren, um ein zweites detektieren Signal zu erzeugen, das ein einheitsspezifischer Marker ist, der sich von dem ersten Signal unterscheidet. Die Reihenfolge der festgestellten Signale bildet einen Hinweis auf die Reihenfolge der zwei einheitsspezifischen Marker.

[0073] In einer Ausführungsform ist das Verfahren ein Verfahren zur Bestimmung des Abstands zwischen zwei einheitsspezifischen Markern des Polymers, wobei die Identität jedes einheitsspezifischen Markers auf die Identität von mindestens einer Einheit des Polymers hinweist, wobei der Abstand zwischen zwei einheitsspezifischen Markern die Signatur des Signals ist. Das markierte Polymer wird linear bezüglich einer Station bewegt, um ein charakteristisches Signal hervorzurufen, das erzeugt wird, wenn jedes der zwei einheitsspezifischen Marker die Station passiert, und der Abstand zwischen den Signalen wird bestimmt als Hinweis auf den Abstand zwischen den zwei einheitsspezifischen Markern.

[0074] In einer anderen Ausführungsformen ist das Verfahren ein Verfahren zur Charakterisierung eines markierten Test-Polymers, wobei mehrere markierte Polymere einer Station gegenüberausgesetzt werden, um eine Signatur von Signalen für jedes der mehreren markierten Polymeren zu erhalten. Das Verfahren beinhaltet die Schritte des Vergleichens der Signatur von Signalen von den mehreren Polymeren, des Bestimmens der Verwandtschaft zwischen den Polymeren auf Basis der Ähnlichkeiten zwischen der Signatur von Signalen

des Polymers, und des Charakterisierens des Polymers auf Grundlage der Signatur von Signalen von verwandten Polymeren.

[0075] Nach noch einer anderen Ausführungsformen ist das Verfahren ein Verfahren zur Sequenzierung eines Polymers aus verbundenen Einheiten. Eine Signatur von Signalen wird von jedem der mehreren überlappenden Polymere erhalten, wobei mindestens ein Teil jedes der Polymere eine Sequenz aus verbundenen Einheiten aufweist, die zu den anderen der Polymere identisch ist, und die Signatur von Signalen wird verglichen, um eine Sequenz von verbundenen Einheiten zu erhalten, die in den mehreren Polymeren identisch ist.

[0076] In einer anderen Ausführungsformen ist das Verfahren ein Verfahren zur Analyse einer Gruppe von Polymeren, wobei jedes Polymer der Gruppe ein individuelles Polymer aus verbundenen Einheiten ist, und wobei die Gruppe von Polymeren parallel zueinander orientiert ist, und ein polymerspezifisches Merkmal des Polymers detektiert wird.

[0077] Jedes der obigen Verfahren beruht auf einer Wechselwirkung zwischen einem Polymer und einer Station, beinhaltend in einigen Ausführungsformen einen Energietransfer oder eine Dämpfung zwischen einer Einheit und einem Mittel, was zur Erzeugung eines Signals führt, und in anderen Ausführungsformen eine physikalische Änderung in der Einheit oder Station, die zur Erzeugung eines Signals führt. Jedes der Verfahren kann mit vielen Polymeren gleichzeitig durchgeführt werden, oder bei nur einem Polymer zur Zeit.

[0078] Verfahren zur gleichzeitigen Analyse mehrerer Polymere auf Grundlage einer Wechselwirkung, die polymerabhängige Impulse zwischen der Einheit und der Station beinhalten, können ebenfalls durchgeführt werden. Diese Verfahren, die unten näher ausgeführt werden, beruhen auf einer Wechselwirkung zwischen einer Einheit und einer Signalerzeugungsstation, die irgendeine Art von polymerabhängigem Impuls erzeugt, der detektiert werden kann. Der polymerabhängige Impuls wird bei Exposition einer Einheit des Polymers gegenüber einer Signalerzeugungsstation erzeugt, erfordert aber nicht, daß eine physikalische Änderung in der Polymerreinheit oder der Station auftritt. Beispielsweise kann der polymerabhängige Impuls aus einem Energietransfer, einer Dämpfung, Änderung der Leitfähigkeit, mechanischen Änderungen, Widerstandsänderungen oder irgend einer anderen physikalischen Änderung resultieren.

[0079] Ein Verfahren zur Charakterisierung eines Test-Polymers ist ein anderer Aspekt der Erfindung. Ein Verfahren zur Charakterisierung eines Test-Polymers wird ausgeführt durch Erhalten polymerabhängiger Impulse für jedes der mehreren Polymere, Vergleichen der polymerabhängigen Impulse der mehreren Polymere, Bestimmen der Verwandtschaft der Polymere auf Grundlage von Ähnlichkeiten zwischen den polymerabhängigen Impulsen des Polymers und Charakterisieren des Test-Polymers auf Grundlage der polymerabhängigen Impulse von verwandten Polymeren.

[0080] Die mehreren Polymere können jede Typ Polymer sein, sind jedoch bevorzugt Nukleinsäuren. In einer Ausführungsform ist die Mehrzahl von Polymeren eine homogene Population. In einer anderen Ausführungsformen ist die Mehrzahl von Polymeren eine heterogene Population. Die Polymere können markiert sein, zufalls- oder nicht zufallsmarkiert. Verschiedene Markierungen können verwendet werden, um verschiedene verbundene Einheiten zu markieren und verschiedene polymerabhängige Impulse zu produzieren.

[0081] Die polymerabhängigen Impulse stellen viele verschiedene Arten von strukturellen Informationen über das Polymer bereit. Beispielsweise können die erhaltenen polymerabhängigen Impulse eine Reihenfolge von polymerabhängigen Impulsen beinhalten oder die erhaltenen polymerabhängigen Impulse können die Zeit der Trennung zwischen spezifischen Signalen oder die Zahl von spezifischen polymerabhängigen Impulsen beinhalten.

[0082] In einer wichtigen Ausführungsform werden die polymerabhängigen Impulse dadurch erzeugt, daß die mehreren Polymere linear an einer Signalerzeugungsstation vorbeibewegt werden.

[0083] Nach einem anderen Aspekt ist die Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung des Abstands zwischen zwei individuellen Einheiten eines Polymers aus verbundenen Einheiten. Das Verfahren beinhaltet die Schritte des (1) Veranlassens, daß das Polymer relativ zu einer Station linear passiert, (2) Detektierens eines polymerabhängigen Impulses, der erzeugt wird, wenn zwei individuelle Einheiten die Signalerzeugungsstation passieren, (3) Messens der Zeit, die zwischen den gemessenen polymerabhängigen Impulsen vergangen ist, (4) Wiederholens der Schritte 1, 2 und 3 für eine Mehrzahl ähnlicher Polymere, um einen Datensatz zu erzeugen, und (5) Bestimmens des Abstands zwischen den zwei individuellen Einheiten auf Basis der von den mehreren ähnlichen Polymeren erhaltenen Information durch Analysieren des Datensatzes. In einer Ausführungsform wer-

den die Schritte (1)–(4) im wesentlichen gleichzeitig ausgeführt.

[0084] Die Mehrzahl von Polymeren kann jede Art Polymer sein, ist jedoch bevorzugt eine Nukleinsäure. In einer Ausführungsform ist die Mehrzahl von Polymeren eine homogene Population. In einer anderen Ausführungsform ist die Mehrzahl von Polymeren eine heterogene Population. Die Polymere können markiert sein, zufalls- oder nicht zufallsmarkiert. Verschiedene Markierungen können verwendet werden, um verschiedene verbundene Einheiten zu markieren und verschiedene polymerabhängige Impulse zu erzeugen.

[0085] In einer Ausführungsform ist der gemessene polymerabhängige Impuls ein erzeugtes Signal aus elektromagnetischer Strahlung. In einer anderen Ausführungsform werden die zwei verbundenen Einheiten einer Signalerzeugungsstation durch Messung der Lichtemission an der Station detektiert. Die Signalerzeugungsstation kann ein Nanokanal sein.

[0086] Nach einem anderen Aspekt ist die Erfindung ein Verfahren zur Feststellung der Reihenfolge von zwei individuellen Einheiten eines Polymers von verbundenen Einheiten. Das Verfahren beinhaltet die Schritte des (1) Bewegens des Polymers linear in Bezug auf eine Signalerzeugungsstation, (2) Aussetzens von einer der individuellen Einheiten der Station gegenüber, um einen polymerabhängigen Impuls zu erzeugen, (3) Aussetzens der anderen der individuellen Einheiten der Station gegenüber, um einen zweiten polymerabhängigen Impuls zu erzeugen, (4) Wiederholens der Schritte 1, 2 und 3 für eine Mehrzahl von ähnlichen Polymeren zur Erzeugung eines Datensatzes, und (5) Feststellens der Reihenfolge der zwei individuellen Einheiten auf Grundlage der von der Mehrzahl ähnlicher Polymere erhaltenen Information durch Analyse des Datensatzes. In einer Ausführungsform werden die Schritte (1)–(4) im wesentlichen gleichzeitig durchgeführt. In einer Ausführungsform ist das gemessene Signal ein Signal aus elektromagnetischer Strahlung.

[0087] Die Mehrzahl von Polymeren kann jede Art Polymer sein, ist jedoch bevorzugt eine Nukleinsäure. In einer Ausführungsform ist die Mehrzahl von Polymeren eine homogene Population. In einer anderen Ausführungsform ist die Mehrzahl von Polymeren eine heterogene Population. Die Polymere können markiert sein, zufalls- oder nicht zufallsmarkiert. Verschiedene Markierungen können verwendet werden, um verschiedene verbundene Einheiten zu markieren und verschiedene polymerabhängige Impulse zu erzeugen.

[0088] In einer Ausführungsform ist der gemessene polymerabhängige Impuls ein erzeugtes Signal aus elektromagnetischer Strahlung. In einer anderen Ausführungsform werden die zwei Einheiten an der Signalerzeugungsstation durch Messung der Lichtemission an der Station detektiert. Die Signalerzeugungsstation kann ein Nanokanal sein.

[0089] Nach einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Sequenzierung eines Polymers aus verbundenen Einheiten bereitgestellt. Das Verfahren beinhaltet die Schritte des Erhaltens polymerabhängiger Impulse von mehreren überlappenden Polymeren, wobei mindestens ein Teil der Polymere eine Sequenz aus verbundenen Einheiten aufweist, die zu der anderen der Polymere identisch ist, und des Vergleichens der polymerabhängigen Impulse, um eine Sequenz von verbundenen Einheiten zu erhalten, die in den mehreren Polymeren identisch ist.

[0090] In einer Ausführungsform sind die Impulse optisch feststellbar. In einer anderen Ausführungsform sind die Nukleinsäuren mit einem Mittel markiert, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einer Quelle elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle, einer Fluoreszenzanregungsquelle und einer Strahlungsquelle.

[0091] Die Mehrzahl von Polymeren kann jede Art Polymer sein, ist jedoch bevorzugt eine Nukleinsäure. In einer Ausführungsform ist die Mehrzahl von Polymeren eine homogene Population. In einer anderen Ausführungsform ist die Mehrzahl von Polymeren eine heterogene Population. Die Polymere können markiert sein, zufalls- oder nicht zufallsmarkiert. Verschiedene Markierungen können verwendet werden, um verschiedene verbundene Einheiten zu markieren und verschiedene polymerabhängige Impulse zu erzeugen.

[0092] Ein Verfahren zur Markierung von Nukleinsäuren wird ebenfalls bereitgestellt. Das Verfahren beinhaltet die Schritte des Inkontaktbringens einer sich teilenden Zelle mit einem Nukleotid-Analogen, Isolierens von Nukleinsäuren von der Zelle, die das Nukleotid-Analogen eingebaut haben, Modifizierens der Nukleinsäuren mit eingebautem Nukleotid-Analogen durch Markieren des eingebauten Nukleotid-Analogs. In einer Ausführungsform ist das Nukleotid-Analogen ein bromiertes Analogon.

[0093] Die sich teilende Zelle kann optional mit einem Nukleotid-Analogen in Kontakt gebracht werden, indem

das Wachstum der Zelle im Zellteilungszyklus angehalten wird, der Kontaktierungsschritt durchgeführt wird und es der Zelle erlaubt wird, wieder in den Zellteilungszyklus einzutreten. Die Nukleinsäuren können anschließend isoliert werden, nachdem die Zellen wieder in den Zellteilungszyklus eingetreten sind und diesen vollendet haben, und bevor ein zweiter Zellteilungszyklus durchlaufen ist.

[0094] In einer anderen Ausführungsform wird das eingebaute Nukleotid-Analogon mit einem Mittel markiert, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einer Quelle elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle.

[0095] Nach einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Analyse einer Gruppe von Polymeren bereitgestellt, wobei jedes Polymer der Gruppe ein individuelles Polymer aus verbundenen Einheiten ist. Das Verfahren beinhaltet den Schritt des Orientierens der Gruppe von Polymeren parallel zueinander und des Bestimmens eines polymerspezifischen Merkmals des Polymers. In einer Ausführungsform findet der Orientierungsschritt in einer Lösung statt, die frei von Gel ist. Die Polymere können durch jedes Verfahren orientiert werden. Eine bevorzugtes Verfahren zur Orientierung der Polymere besteht darin, ein elektrisches Feld an die Polymere anzulegen.

[0096] Die Mehrzahl von Polymeren kann jede Art Polymer sein, ist jedoch bevorzugt eine Nukleinsäure. In einer Ausführungsform ist die Mehrzahl von Polymeren eine homogene Population. In einer anderen Ausführungsformen ist die Mehrzahl von Polymeren eine heterogene Population. Die Polymere können markiert sein, zufalls- oder nicht zufallsmarkiert. Verschiedene Markierungen können verwendet werden, um verschiedene verbundene Einheiten zu markieren und verschiedene polymerabhängige Impulse zu erzeugen.

[0097] Das polymerspezifische Merkmal ist Information über ein strukturelles Merkmale eines Polymers. Das polymerspezifische Merkmal kann ein Reihenfolge von verbundenen Einheiten in dem Polymer sein.

[0098] In einer Ausführungsform wird der Detektionsschritt gleichzeitig für die Polymere durchgeführt. In einer anderen Ausführungsform umfaßt der Detektionsschritt die Messung von Signalen aus elektromagnetischer Strahlung. Nach einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt der Detektionsschritt das Veranlassen des Polymers, linear in Bezug auf eine Mehrzahl von Signalerzeugungsstationen zu passieren und das Detektieren und Unterscheiden polymerabhängiger Impulse, die erzeugt werden, wenn die Polymere die Signalerzeugungsstationen passieren.

[0099] Nach einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Analyse einer Gruppe von Polymeren bereitgestellt, wobei jedes Polymer der Gruppe ein individuelles Polymer aus verbundenen Einheiten ist. Das Verfahren beinhaltet die Schritte des Orientierens der Gruppe von Polymeren in einem elektrischen Feld, des gleichzeitigen Bewegens der Gruppe von Polymeren durch bestimmte entsprechende Kanäle und des Detektierens eines polymerspezifischen Merkmals bei der Bewegung der Polymere durch die Kanäle. In einer Ausführungsform findet der Orientierungsschritt in einer Lösung statt, die frei von Gel ist. Bevorzugt sind die Kanäle Nanokanäle.

[0100] Die Mehrzahl von Polymeren kann jede Art Polymer sein, ist jedoch bevorzugt eine Nukleinsäure. In einer Ausführungsform ist die Mehrzahl von Polymeren eine homogene Population. In einer anderen Ausführungsformen ist die Mehrzahl von Polymeren eine heterogene Population. Die Polymere können markiert sein, zufalls- oder nicht zufallsmarkiert. Verschiedene Markierungen können verwendet werden, um verschiedene verbundene Einheiten zu markieren und verschiedene polymerabhängige Impulse zu erzeugen.

[0101] Das polymerspezifische Merkmal ist Information über ein strukturelles Merkmal eines Polymers. Das polymerspezifische Merkmal kann eine Reihenfolge von verbundenen Einheiten in dem Polymer sein.

[0102] In einer Ausführungsform wird der Detektionsschritt gleichzeitig für die Polymere durchgeführt. In einer anderen Ausführungsform umfaßt der Detektionsschritt die Messung von Signalen aus elektromagnetischer Strahlung. Nach einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt der Detektionsschritt das Veranlassen des Polymers, linear in Bezug auf eine Mehrzahl von Signalerzeugungsstationen zu passieren und das Detektieren und Unterscheiden polymerabhängiger Impulse, die erzeugt werden, wenn die Polymere die Signalerzeugungsstationen passieren.

[0103] Die erfindungsgemäßen Verfahren können mit einem Herstellungsartikel ausgeführt werden, der bereitgestellt wird. Der Herstellungsartikel enthält ein Wandmaterial mit einer einen Kanal definierenden Oberfläche, ein Mittel, wobei das Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einer Quelle elektromagneti-

scher Strahlung, einer Dämpfungsquelle, einer Schicht aus einem lumineszierenden Film und einer Fluoreszenzanregungsquelle, die an dem Wandmaterial in Nachbarschaft zu dem Kanal angeheftet ist, wobei das Mittel sich dicht genug am Kanal befindet und in einer Menge vorhanden ist, die ausreicht, um detektierbar mit einer Partnerverbindung zu wechselwirken, die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einer lichtemittierenden Verbindung, einer lichtaufnehmenden Verbindung, einer strahlenden Verbindung und einem Dämpfungsmittel, die/das den Kanal passiert. Vorzugsweise ist der Kanal ein Träger für ein Polymer.

[0104] Das Mittel kann eine Quelle elektromagnetischer Strahlung sein und die Quelle elektromagnetischer Strahlung ist eine lichtemittierende Verbindung. In einer anderen Ausführungsform ist der Kanal ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem Mikrokanal und einem Nanokanal.

[0105] Die Oberfläche des Wandmaterials, das den Kanal definiert, kann frei von der lichtemittierenden Verbindung sein. Die lichtemittierende Verbindung kann an eine externe Oberfläche des Wandmaterials angeheftet sein. In noch einer anderen Ausführungsform ist die lichtemittierende Verbindung an einen Linker angeheftet, der angeheftet ist an die externe Oberfläche des Wandmaterial. Die lichtemittierende Verbindung kann in das Wandmaterial oder in einer Schicht von oder auf dem Wandmaterial eingebettet sein. Die lichtemittierende Verbindung kann in einem Bereich der externen Oberfläche des Wandmaterials konzentriert sein, die einen Teil des Kanals umgibt. Die lichtemittierende Verbindung kann in dem Wandmaterial einen konzentrischen Ring um einen Teil des Kanals bilden. Eine maskierende Schicht mit Öffnungen, die die Exposition von lediglich lokal begrenzten Flächen der lichtemittierenden Verbindung erlaubt, kann ebenfalls Bestandteil des Herstellungsartikels sein.

[0106] Eine zweite lichtemittierende Verbindung, die sich von der ersten unterscheidet, kann an dem Wandmaterial in Nachbarschaft zu dem Kanal angeheftet sein, wobei die lichtemittierende Verbindung nahe genug an dem Kanal liegt und in einer Menge anwesend ist, die für eine detektierbare Wechselwirkung mit einer lichtemittierenden Partnerverbindung, die den Kanal passiert, wirksam ist.

[0107] Das Wandmaterial kann aus verschiedenen Schichten bestehen. Die äußere Oberfläche des Wandmaterials in Nachbarschaft zu der lichtemittierenden Verbindung kann eine leitende Schicht sein. Das Wandmaterial kann zwei Schichten umfassen, die leitende Schicht und eine nichtleitende Schicht. Das Wandmaterial kann auch aus mindestens zwei Schichten bestehen, einer ersten Schicht, die die Signalerzeugung verhindert und einer zweiten Schicht, die die Signalerzeugung erlaubt. Alternativ ist das zu der lichtemittierenden Verbindung benachbarte Wandmaterial eine lichtundurchlässige Schicht. Das Wandmaterial kann zwei Schichten umfassen, die lichtundurchlässige Schicht und eine lichtdurchlässige Stützschiicht. Das Wandmaterial kann eine zweite lichtundurchlässige Schicht auf einer zweiten Seite der lichtemittierenden Verbindung sein, wobei die erste und zweite Schicht die lichtemittierende Verbindung sandwichartig umgeben. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die lichtemittierende Verbindung eine fluoreszierende Verbindung.

[0108] Der Kanal kann jegliche Form oder Abmessungen aufweisen. Bevorzugt ist der Kanal ein Nanokanal mit Abmessungen zwischen 1 Ångström und 1 mm. Bevorzugt beträgt die Weite des Kanals zwischen 1 und 500 Ångström. Bevorzugt enthält die Wand viele Kanäle. Bevorzugt beinhaltet das Wandmaterial mindestens zwei und besonders bevorzugt mindestens 50 Kanäle.

[0109] Das Wandmaterial kann aus zwei Schichten gebildet sein, einer ersten lichtundurchlässigen Schicht und einer Schicht aus einem lumineszierenden Film, die aneinandergeheftet sind, wobei der Kanal sich durch beide Schichten erstreckt und durch Oberflächen der beiden Schichten definiert ist. Bevorzugt ist der Kanal ein Nanokanal. Die Länge des Kanals kann zwischen 1 Ångström und 1 mm betragen. Der Artikel kann eine zweite lichtundurchlässige Schicht enthalten, wobei die Schicht lumineszierenden Films zwischen den ersten und zweiten lichtundurchlässigen Schichten angeordnet ist. Bevorzugt schließt die den Kanal definierende Oberfläche eine Oberfläche der lichtundurchlässigen Schicht ein, die frei ist von Material der Schicht lumineszierenden Films.

[0110] Das Mittel kann eine Fluoreszenzanregungsquelle sein, wobei die Fluoreszenzanregungsquelle eine Szintillationsschicht ist. Die Szintillationsschicht kann ausgewählt sein aus der Gruppe, bestehend aus NaI (TI), ZnS (Ag), Anthracen, Stilben und Kunststoff-Phosphor. Bevorzugt ist die Szintillationsschicht in das Wandmaterial zwischen zwei strahlungsundurchlässigen Schichten eingebettet, wie beispielsweise Blei oder Lucite.

[0111] Ein Herstellungsartikel kann ein Wandmaterial sein, das eine eine Mehrzahl von Kanälen bildende Oberfläche sowie eine an einem bestimmten Bereich des Wandmaterials in Nachbarschaft zu mindestens einem der Kanäle angeheftete Station aufweist, wobei die Station nahe genug an dem Kanal liegt und in einer

ausreichenden Menge zugegen ist, um zu verursachen, daß ein Signal einer detektierbaren physikalischen Änderung in einem den Kanal passierenden Polymer aus verbundenen Einheiten oder in der Station entsteht, wenn das Polymer der Station gegenüberausgesetzt wird.

[0112] Der Artikel ist ein Wandmaterial mit einer einen Kanal definierenden Oberfläche und einer Mehrzahl von jeweils an einem bestimmten Bereich des Wandmaterials benachbart zu dem Kanal angehefteten Stationen, wobei die Stationen nahe genug an dem Kanal liegen und in einer ausreichenden Menge zugegen sind, um zu verursachen, daß ein Signal einer detektierbaren physikalischen Änderung in einem den Kanal passierenden Polymer aus verbundenen Einheiten oder in der Station entsteht, wenn das Polymer der Station gegenüberausgesetzt wird.

[0113] Das Wandmaterial kann durch kovalentes Binden von lichtemittierenden Verbindungen oder dämpfenden Verbindungen an eine Mehrzahl von diskreten Orten eines Wandmaterials hergestellt werden, wobei jeder der diskreten Orte nahe genug zu einer entsprechenden Wechselwirkungsstation auf dem Wandmaterial liegt, und wobei, wenn eine individuelle Einheit eines Polymers, die mit der lichtemittierenden Verbindung oder dämpfenden Verbindung zur Erzeugung eines Signals wechselwirken kann, an der Wechselwirkungsstation angeordnet ist, die lichtemittierende Verbindung oder die dämpfende Verbindung mit der individuellen Einheit zur Erzeugung eines Signals wechselwirkt. Bevorzugt beinhaltet das Verfahren den Schritt des Aufbringens einer Schicht aus leitenden Material auf das Wandmaterial.

[0114] Die lichtemittierenden Verbindungen oder dämpfenden Verbindungen können kovalent an diskreten Orten dicht an dem Kanal in dem Wandmaterial gebunden sein, wobei die Kanäle die Wechselwirkungsstationen bilden. Die Kanäle sind bevorzugt Mikrokanäle oder Nanokanäle. Die lichtemittierenden Verbindungen oder dämpfenden Verbindungen können in einer Weise kovalent an das Wandmaterial gebunden sein, daß die den Kanal definierenden Oberflächen des Wandmaterials frei sind von den lichtemittierenden Verbindungen und den dämpfenden Verbindungen.

[0115] Eine chemische Substanz kann selektiv an einem Rand eines Kanals durch ein Wandmaterial angeheftet sein, das opak ist. Das Verfahren beinhaltet die Schritte des Bereitstellens eines Wandmaterials mit an dem Rand des Kanals durch das Wandmaterial angehefteten photoprotektiven chemischen Gruppen, Anwendens von Licht gegenüber den photoprotektiven chemischen Gruppen, um den chemischen Gruppen ihre photoprotektiven Eigenschaften zu nehmen an und des Anbringens der chemischen Substanz an die entschützten chemischen Gruppen.

[0116] Das Licht kann an lediglich ausgewählten Bereichen der Oberfläche des Wandmaterials, die den Rand des Kanals bilden, angewendet werden. Der Kanal kann ein erstes Ende und ein zweites Ende aufweisen, wobei der Rand sich an dem ersten Ende befindet, und wobei das Licht an dem zweiten Ende angewendet wird, und wobei das Licht den Kanal passiert, um die photoprotektiven chemischen Gruppen am Rand des ersten Endes zu kontaktieren. Die Kanäle sind vorzugsweise Mikrokanäle oder Nanokanäle.

[0117] Ein Wandmaterial mit lokal begrenzten Flächen für die Lichtemission auf einer Oberfläche des Wandmaterials kann hergestellt werden durch Bereitstellen eines Wandmaterials mit einer Oberfläche und Aufbringen einer lichtemittierenden Verbindung auf die Oberfläche zur Herstellung von zumindest lokal begrenzten Flächen für die Lichtemission auf der Oberfläche, wobei die lokal begrenzten Flächen eine Zielregion für die Detektion der Lichtemission definieren, und wobei die Zielregion ein Rand eines Kanals durch das Wandmaterial ist. In einer Ausführungsform beinhaltet das Verfahren ferner die Schritte des Anbringens einer photoprotektiven chemischen Gruppe an der Oberfläche des Wandmaterials, Anwendens von Licht auf die photoprotektiven chemischen Gruppen vor dem Anbringen der lichtemittierenden Verbindung, um den chemischen Gruppen ihre photoprotektive Wirkung zu nehmen, und des Anheftens der lichtemittierenden Verbindung an die entschützten chemischen Gruppen.

[0118] Das Licht kann lediglich in ausgewählten Bereichen einer Oberfläche des Wandmaterials angewendet werden, die den Rand des Kanals bilden. Die photoprotektive chemische Gruppe kann an lediglich ausgewählten Bereichen der Oberfläche des Wandmaterials, die den Rand des Kanals bildet, angeheftet sein. Der Kanal kann ein erstes Ende und ein zweites Ende aufweisen, wobei sich der Rand an dem ersten Ende befindet, und wobei das Licht auf das zweite Ende angewendet wird, und wobei das Licht den Kanal passiert, um die photoprotektiven chemischen Gruppen am Rand des ersten Endes zu kontaktieren. Die Kanäle sind bevorzugt Mikrokanäle oder Nanokanäle.

[0119] Das Verfahren kann den weiteren Schritt beinhalten des Anordnens einer Maske mit Öffnungen über

der Oberfläche des Wandmaterials, so daß nur lokal begrenzte Flächen der Lichtemission durch die Öffnungen in der Maske exponiert sind. In einer Ausführungsform ist die lichtemittierende Verbindung an einem Teil der Oberfläche des Wandmaterials angeheftet.

[0120] Eine Vorrichtung zur Detektion eines Signals unter Verwendung der erfindungsgemäßen Verfahren ist ein Gehäuse mit einer Pufferkammer, einer einen Teil der Pufferkammer bildenden Wand, aufweisend eine Mehrzahl von Öffnungen zur Ausrichtung von Polymeren, einen Sensor, der dem Gehäuse fest zugeordnet ist, wobei der Sensor die Signale, die an jeder Öffnung emittiert werden, von Signalen unterscheidet, die an den anderen Öffnungen emittiert werden, um öffnungsabhängige Sensorsignale zu erzeugen, und einen Speicher zur Erfassung und Speicherung der Sensorsignale. Der Sensor kann ein optischer Sensor sein.

[0121] Der optische Sensor detektiert Signale elektromagnetischer Strahlung, die an den mehreren Öffnungen emittiert werden. Die Vorrichtung kann einen Mikroprozessor beinhalten.

[0122] Die Öffnungen können durch Kanäle in der Wand gebildet sein. Bevorzugt sind die Öffnungen durch Mikrokanäle in der Wand gebildet. Besonders bevorzugt sind die Öffnungen durch Nanokanäle in der Wand gebildet. Die Mehrzahl von Öffnungen kann mindestens zwei, vorzugsweise mindestens 50 sein.

[0123] Die Vorrichtung kann eine zweite Pufferkammer beinhalten, die von der ersten Pufferkammer durch die Wand getrennt ist, wobei die Pufferkammern sich über Öffnungen in Flüssigverbindung miteinander befinden. Die Vorrichtung kann ein Paar von Elektroden beinhalten, die in dem Gehäuse angebracht sind, wobei die eine des Paares in der ersten Pufferkammer angeordnet ist, und die andere des Paares in der zweiten Pufferkammer angeordnet ist.

[0124] Eine andere Vorrichtung zur Detektion eines Signals kann ein Gehäuse beinhalten, das eine erste Pufferkammer und eine zweite Pufferkammer bildet, eine Wand, die von dem Gehäuse getragen wird und die erste und zweite Pufferkammer trennt, eine Mehrzahl von durch die Wand definierten Kanälen, die eine Flüssigverbindung zwischen der ersten und zweiten Pufferkammer bereitstellen, und einen Sensor zur Unterscheidung und Erfassung von kanalabhängigen Signalen. Bevorzugt ist der Kanal ein Mikrokanal oder ein Nanokanal. Die Mehrzahl von Kanälen kann mindestens zwei, vorzugsweise mindestens 50 sein. Bevorzugt ist das Signal ein optisches Signal.

[0125] Die den Kanal umgebende Wand kann ein Mittel, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle, an der Wand angeheftet beinhalten. Bevorzugt ist das Mittel elektromagnetische Strahlung und die elektromagnetische Strahlung eine lichtemittierende Verbindung. Bei einer Ausführungsform ist die lichtemittierende Verbindung an den Kanälen in der Wand konzentriert.

[0126] Die Vorrichtung kann ein Mittel zum Bewegen biologischer Einheiten durch die Kanäle beinhalten.

[0127] Eine andere Vorrichtung beinhaltet ein Gehäuse und eine Pufferkammer, eine einen Teil der Pufferkammer bildende Wand, wobei die Wand Polymerwechselwirkungsstationen beinhaltet, und einen an dem Gehäuse angebrachten optischen Sensor, wobei der optische Sensor dazu konstruiert und angeordnet ist, Signale elektromagnetischer Strahlung, die an den Wechselwirkungsstationen emittiert werden, zu detektieren.

[0128] Ein Computersystem zur Erstellung charakteristischer als Antwort auf eine Anfrage erhältlicher Informationen von einer Mehrzahl von Polymeren kann bereitgestellt werden. Das System besitzt einen Speicher zur Speicherung von Datensätzen für die Mehrzahl von Polymeren in einer Weise, daß unter Verwendung einer einzigartigen Kennung für das Polymer ein Zugriff erfolgen kann, eingeschlossen Informationen, die für nacheinander detektierte Signale indikativ sind, die bei einer detektierbaren physikalischen Änderung in der Mehrzahl der individuellen Einheiten des Polymeres oder einer Station, der gegenüber das Polymer ausgesetzt ist, entstehen, und einen Prozessor für den Zugriff auf die in dem Speicher gespeicherten Datensätze für ein aus der Mehrzahl der Polymere ausgewähltes Polymer mittels einer einzigartigen Kennung, die mit dem ausgewählten Polymer verbunden ist.

[0129] Das Signal kann aus einer Wechselwirkung einer Mehrzahl von individuellen Einheiten des Polymere mit einem Mittel resultieren, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle. Das Computersystem kann auch Mittel beinhalten zum Vergleichen der nacheinander detektierten Signale des ausgewählten Polymers mit einem bekannten Muster von Signalen, das für ein bekanntes Polymer charakteristisch ist, um die Verwandtschaft des

ausgewählten Polymers mit dem bekannten Polymer zu ermitteln.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0130] Fig. 1 zeigt ein Schema für ein Zufallsmarkierungsverfahren.

[0131] Fig. 2 ist eine Grafik von Rohdaten, die die Änderungen in den Energieemissionsmustern zur Feststellung von Abstandsinformationen durch das Ist-Raten-Verfahren zeigt. Die Änderungen in den Energiemustern resultieren aus nacheinander detektierbaren Signalen, die dann aufgezeichnet werden, um eine Kurve zu erhalten, die von links nach rechts zwei Energieintensitätsabnahmen, gefolgt von zwei Energieintensitätsanstiegen zeigt. Die Rate beträgt $6,8 \text{ A/s}$ und t_1 ist die Zeit zwischen dem Eintritt des ersten und zweiten Markers.

[0132] Fig. 3 zeigt eine repräsentative Population von A-zufallsmarkierten Fragmenten für ein 16-mer mit der Sequenz 5'ACGTACGTACGTACGT'3 und stellt auch dar, wie die Abstandsinformation verwendet wird, um den Basenabstand zwischen akzeptormarkierten Nukleotiden zu bestimmen.

[0133] Fig. 4 ist ein Schema, das verschiedene mögliche Konstruktionen einer Nanokanalplatte darstellt.

[0134] Fig. 5 ist ein Schema, das eine Nanokanalplatte zur Analyse eines radioaktiven Polymers darstellt.

[0135] Fig. 6 ist ein Schema eines Querschnitts eines Nanokanals mit einem konzentrischen Ring von Donor-Fluorophoren und eine Grafik, die die Donor-Emission und den Energietransfer auf den entsprechenden Nanokanal darstellt.

[0136] Fig. 7 zeigt ein Modell einer Nanokanalplatte, die mehrere Nanokanäle mit einer Schicht von Donor-Fluorophoren innerhalb der Platte aufweist. Fig. 7B zeigt eine vergrößerte Darstellung eines einzelnen Nanokanals mit einem einzelnen Akzeptor, der zu einer leitenden Schicht benachbart angeordnet ist.

[0137] Die Fig. 8A und B sind Schemata, die die Signalerzeugung bei Passage eines Akzeptor-Markers durch den Nanokanal darstellen. Fig. 8A zeigt eine vergrößerte Darstellung eines Nanokanals. Fig. 8B veranschaulicht grafisch die ausgeprägte Änderung in der Donor-Intensität, wenn ein Akzeptor-Marker von Position A nach C wandert.

[0138] Fig. 9 stellt schematische und grafisch die Passage von zweibasemarkierten Strängen von DNA durch einen Nanokanal mit der geeigneten Dicke und den geeigneten Radien von Donor-Fluorophoren, die sandwichartig zwischen leitendem Material angeordnet sind, dar.

[0139] Fig. 10 ist eine Volumengrafik, die die Änderung der Donor-Emission in der Anwesenheit von einem oder zwei Akzeptoren visuell darstellt. Fig. 10B zeigt die Änderung für einen Akzeptor.

[0140] Fig. 11 zeigt Ergebnisse eines Versuchs, der zeigt, daß DNA hergestellte Nanokanal durchlaufen kann.

[0141] Fig. 12 zeigt eine Vorrichtung, die ausgebildet ist, eine Nanokanal- (oder Mikrokanal-) Platte, zu halten, die in der Lage ist, ein elektrisches Feld zu erzeugen.

[0142] Fig. 13 stellt eine Nanokanal-Vorrichtung dar, die aus zwei verbundenen Pyrex-Zellen, die die Nanokanal-Platte halten, einer oberen und unteren Pufferregion, Elektroden, einem Immersionsobjektiv und einer Spannungsversorgung besteht.

[0143] Fig. 14 ist ein schematisches Diagramm einer basenspezifischen In-vitro-Markierung (IBSA).

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0144] Die Erfindung umfaßt Verfahren zur Analyse oder Identifizierung eines Polymers oder einer Einheit eines Polymers durch Detektieren eines Signals oder polymerabhängigen Impulses, das/der aus einer Wechselwirkung zwischen mindestens einer Einheit des Polymers und einer Station oder einem Mittel oder durch eine Änderung in der Einheit oder einer Station, wenn die Einheit der Station gegenüber ausgesetzt wird, resultiert. Unter "Analyse" eines Polymers wird verstanden, einige Informationen über die Struktur des Polymers wie beispielsweise seine Größe, die Reihenfolge seiner Einheiten, seine Verwandtschaft zu anderen Polymeren, die

Identität seiner Einheiten oder seine Anwesenheit zu erhalten. Da die Struktur und Funktion von biologischen Molekülen voneinander abhängig sind, ergibt die Strukturinformation eine wichtige Informationen über die Funktion des Polymers.

[0145] Eines der Verfahren gemäß der Erfindung ist ein Verfahren zur Analyse eines Polymers aus verbundenen Einheiten durch Aussetzen mehrerer Einheiten des Polymers einem Mittel gegenüber, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle in einer Weise, daß jede der einzelnen Einheiten mit dem Mittel wechselwirkt, um ein detektierbares Signal zu erzeugen. Das Signal, das aus der Wechselwirkung resultiert, wird sequentiell detektiert.

[0146] So wie hier verwendet, wird eine Einheit eines Polymers einem Mittel oder einer Station gegenüber "ausgesetzt" bzw. "exponiert" durch Anordnen oder Präsentieren der Einheit und des Mittels oder der Station in Wechselwirkungsnähe zueinander, so daß ein Energietransfer oder eine Dämpfung oder eine physikalische Änderung in der Einheit oder dem Mittel oder der Station zwischen ihnen zur Erzeugung eines detektierbaren Signals auftreten kann. Unter Wechselwirkungsnähe wird nahe genug, um eine Wechselwirkung oder Änderung zu erlauben, die ein detektierbares Signal ergibt, verstanden.

[0147] Bei einer Ausführungsform werden die Einheiten des Polymers dem Mittel gegenüber sequentiell ausgesetzt. Mit "sequentiell ausgesetzt" ist im allgemeinen gemeint: zeitlich voneinander getrennt. In einer bevorzugten Ausführungsform werden das Polymer und das Mittel dazu veranlaßt, sich relativ zueinander in einer "linearen" Weise zu bewegen, so daß jede Einheit des Polymers innerhalb von Wechselwirkungsnähe zu dem Mittel an einer Wechselwirkungsstation vorbeiwandert. Wenn jeder Einheit des Polymers mit dem Mittel oder der Station wechselwirkt, wird ein detektierbares Signal erzeugt. Das detektierbare Signalen kann aufgefangen (sequentiell detektiert) und durch eine Detektionsvorrichtung aufgezeichnet werden. Das für jede Einheit erzeugte detektierbare Signal kann auf die Art der Einheit hinweisen. So wie hier verwendet, werden Signale "sequentiell" detektiert, wenn die Signale von verschiedenen Einheiten eines einzelnen Polymers zeitlich voneinander getrennt detektiert werden. Nicht alle Einheiten müssen "sequentiell" detektiert werden oder müssen ein Signal zur "sequentiellen" Detektion eines Signals erzeugen.

[0148] Wenn die Einheiten sequentiell dem Mittel oder der Station ausgesetzt gegenüber werden, bewegen sich die Einheit und das Mittel oder die Station relativ zueinander. So wie hier verwendet, bedeutet der Ausdruck "die Einheit und das Mittel oder die Station bewegen sich relativ zueinander", daß entweder die Einheit und das Mittel oder die Station sich beide bewegen oder nur eins von den beiden sich bewegt und das andere zumindest über die Zeit der Wechselwirkung zwischen der Einheit und dem Mittel oder der Station stationär bleibt. Die Einheit und das Mittel oder die Station können sich relativ zueinander durch jede Art Mechanismus bewegen. Beispielsweise können das Mittel oder die Station stationär bleiben und das Polymer kann durch einen elektrischen Strom an dem Mittel oder der Station vorbeigezogen werden. Andere Verfahren zur Bewegung des Polymers beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf Bewegung als Ergebnis eines magnetischen Feldes, einer mechanischen Kraft, eines fließenden flüssigen Mediums, eines Drucksystems, einer Gravitationskraft und eines Molekülmotors wie zum Beispiel einer DNA-Polymerase oder einer Helikase, wenn das Polymer DNA ist, oder zum Beispiel Myosin, wenn das Polymer ein Peptid wie beispielsweise Aktin ist. Die Bewegung des Polymers kann durch Verwendung eines Kanals, einer Rinne oder eines Rings zur Führung des Polymers unterstützt werden. Alternativ kann das Mittel oder die Station bewegt werden und das Polymer kann stationär bleiben. Beispielsweise kann das Mittel oder die Station innerhalb einer Rasterspitze, die entlang der Länge des Polymers geführt wird, gehalten sein.

[0149] In einer anderen Ausführungsform werden Signale gleichzeitig detektiert. Wie hier verwendet, werden Signale "gleichzeitig detektiert", indem eine Mehrzahl von markierten Einheiten eines Polymers einem Mittel oder einer Station gegenüber auf einmal ausgesetzt wird. Die Mehrzahl dieser Einheiten kann dem Mittel oder der Station gegenüber zu einer Zeit durch Verwendung mehrerer Wechselwirkungsstellen ausgesetzt werden. An jeder dieser Stellen können Signale gleichzeitig detektiert werden. Beispielsweise können mehrere Mittel oder Stationen an bestimmten Orten im Raum angeordnet sein, die den Einheiten des Polymers entsprechen. Wenn das Polymer in Wechselwirkungsnähe zu den mehreren Mittel oder Stationen gebracht wird, werden gleichzeitig Signale erzeugt. Dies kann beispielsweise durch eine lineare Anordnung von Mitteln oder Stationen verkörpert werden, die in im wesentlichen gleichen Abständen angeordnet sind, die den Abständen zwischen den Einheiten entsprechen. Das Polymer kann in Bezug auf das Mittel oder die Station in einer Weise angeordnet sein, daß jede Einheit sich in Wechselwirkungsnähe mit einem Mittel oder einer Station zur Erzeugung gleichzeitiger Signale befindet.

[0150] Wenn die Signale sequentiell detektiert werden, können mehrere Polymere gleichzeitig analysiert werden. Mehrere Polymere werden gleichzeitig analysiert, indem man mehr als ein Polymer zur Zeit veranlaßt, sich in Bezug auf entsprechende Mittel oder Stationen zu bewegen. Die Polymere können ähnlich oder verschieden sein. Wenn die Polymere ähnlich sind, können dieselben oder verschiedene Einheiten gleichzeitig detektiert werden. Es ist bevorzugt, das mindestens zwei Polymere gleichzeitig analysiert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform werden mindestens 50 Polymere gleichzeitig analysiert und in einer anderen bevorzugten Ausführungsform werden mindestens 100 Polymere gleichzeitig analysiert.

[0151] Ein "Polymer" wie hier verwendet ist eine Verbindung, die ein lineares Rückgrat von individuellen Einheiten, die durch Bindungen miteinander verbunden sind, aufweist. In einigen Fällen kann das Rückgrat des Polymers verzweigt sein. Bevorzugt ist das Rückgrat unverzweigt. Der Begriff "Rückgrat" ("backbone") wird in seiner in der Polymerchemie üblichen Bedeutung verwendet. Die Polymere können bezüglich der Rückgratzusammensetzung heterogen sein, und jede mögliche Kombination von Polymereinheiten miteinander verknüpft enthalten, wie beispielsweise Peptidnukleinsäuren (die Aminosäuren verknüpft an Nukleinsäuren aufweisen und eine verbesserte Stabilität besitzen). In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Polymere bezüglich der Rückgratzusammensetzung homogen und sind zum Beispiel Nukleinsäuren, Polypeptide, Polysaccharide, Kohlenhydrate, Polyurethane, Polycarbonate, Polyharnstoffe, Polyethylenimine, Polyarylsulfide, Polysiloxane, Polyamide, Polyacetate, Polyamide, Polyester oder Polythioester. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform ist das Polymer eine Nukleinsäure oder ein Polypeptid. Eine "Nukleinsäure" wie hier verwendet ist ein Biopolymer, das aus Nukleotiden besteht, wie beispielsweise Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA). Ein Polypeptid wie hier verwendet ist ein Biopolymer, das aus verbundenen Aminosäuren besteht.

[0152] Wie hier mit Bezug auf verbundene Einheiten eines Polymers verwendet, bedeutet "verbunden" oder "Bindung", daß zwei Einheiten durch irgendein physikalisch-chemisches Mittel miteinander verbunden sind. Jede Bindung, die dem Fachmann bekannt ist, kovalent oder nichtkovalent, ist umfaßt. Solche Bindungen sind dem Fachmann sehr gut bekannt. Natürliche Bindungen, die üblicherweise in der Natur gefunden werden, und die individuelle Einheiten eines bestimmten Polymers verbinden, sind am häufigsten. Natürliche Bindungen beinhalten beispielsweise Amid-, Ester- und Thioesterbindungen. Die individuellen Einheiten eines Polymers, das durch die erfindungsgemäßen Verfahren analysiert wird, kann jedoch durch synthetische oder modifizierte Bindungen verbunden sein. Polymere, bei denen die Einheiten durch kovalente Bindungen verbunden sind, werden am häufigsten sein, schließen aber auch durch Wasserstoffbrücken etc. verbundene ein.

[0153] Das Polymer besteht aus einer Mehrzahl von individuellen Einheiten. Eine "individuelle Einheit" wie hier verwendet ist ein Baustein oder Monomer, der/das direkt oder indirekt mit anderen Bausteinen oder Monomeren verbunden sein kann, um ein Polymer zu bilden. Das Polymer ist bevorzugt ein Polymer aus mindestens zwei verschiedenen verbundenen Einheiten. Die mindestens zwei verschiedenen verbundenen Einheiten können verschiedene Signale erzeugen oder markiert sein, um verschiedene Signale zu erzeugen, wie weiter unten in größerer Ausführlichkeit dargestellt wird. Die jeweilige Art von Einheit hängt von der Art des Polymers ab. Beispielsweise ist DNA ein Biopolymer, das aus einem Desoxyribosephosphat-Rückgrat besteht, das aus Einheiten von Purinen und Pyrimidinen wie beispielsweise Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, 5-Methylcytosin, 2-Aminopurin, 2-Amino-6-chlorpurin, 2,6-Diaminopurin, Hypoxanthin und anderen natürlichen oder nicht natürlich vorkommenden Nukleobasen, substituierten und nichtsubstituierten aromatischen Resten zusammengesetzt ist. RNA ist ein Biopolymer, das aus einem Ribosephosphat-Rückgrat besteht, das aus Einheiten von Purinen und Pyrimidinen wie denen, die für DNA beschrieben wurden, zusammengesetzt ist, wobei Thymin jedoch durch Uracil ersetzt ist. Die DNA-Einheiten können mit den anderen Einheiten des Polymers durch deren 5'- oder 3'-Hydroxyl-Gruppen verbunden sein, wodurch eine Esterbindung gebildet wird. RNA-Einheiten können mit anderen Einheiten des Polymers durch deren 5'-, 3'- oder 2'-Hydroxyl-Gruppen verbunden sein, wodurch eine Esterbindung gebildet wird. Alternativ können DNA- oder RNA-Einheiten mit einer terminalen 5'-, 3'- oder 2'-Aminogruppe mit den anderen Einheiten des Polymers durch die Aminogruppe verbunden sein, wodurch eine Amidbindung gebildet wird. Die individuellen Einheiten eines Polypeptids sind Aminosäuren, einschließlich der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren, sowie modifizierte Aminosäuren. A-Aminosäuren können als Amide oder freie Säuren vorkommen und sind mit anderen Einheiten in dem Rückgrat des Polymers durch ihre α -Aminogruppe verbunden, wodurch sie eine Amidbindung mit dem Polymer bilden.

[0154] Eine "Mehrzahl von individuellen Einheiten" sind mindestens zwei Einheiten, die miteinander verbunden sind.

[0155] Immer wenn eine Nukleinsäure durch eine Sequenz von Buchstaben dargestellt wird, ist es ersichtlich, das die Nukleotide in 5'→3'-Reihenfolge von links nach rechts angeordnet sind, und das "A" Adenosin bedeutet,

"C" Cytidin bedeutet, "G" Guanosin bedeutet, "T" Thymidin bedeutet und "U" Uracil bedeutet, sofern nicht anderweitig angegeben.

[0156] Die Polymere können native oder natürlich vorkommende Polymere sein, die in der Natur vorkommen, oder nicht-natürlich vorkommende Polymere sein, die in der Natur nicht existieren. Die Polymere beinhalten typischerweise mindestens einen Anteil natürlich vorkommender Polymere. Die Polymere können isoliert oder de novo synthetisiert sein. Beispielsweise können die Polymere aus natürlichen Quellen isoliert, zum Beispiel durch Spaltung und Geltrennung gereinigt sein, oder können synthetisiert sein, zum Beispiel (i) in vitro durch zum Beispiel Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert sein; (ii) zum Beispiel durch chemische Synthese synthetisiert sein; (iii) rekombinant durch Klonen etc. hergestellt sein.

[0157] Das Polymer oder mindestens eine Einheit davon liegt in einer Form vor, die in der Lage ist, mit einem Mittel oder einer Station zur Erzeugung eines Signals zu wechselwirken, das für diese Wechselwirkung charakteristisch ist. Eine Einheit eines Polymers, die in der Lage ist, eine solche Wechselwirkung durchzumachen, wird als markiert bezeichnet. Wenn eine Einheit eines Polymers eine Wechselwirkung durchmachen kann, um ein charakteristisches Signale zu erzeugen, wird das Polymer als intrinsisch markiert bezeichnet. Es ist nicht erforderlich, daß eine extrinsische Markierung zu dem Polymer hinzugefügt wird. Wenn ein nicht-natives Molekül jedoch an eine individuelle Einheit eines Polymers zur Erzeugung der Wechselwirkung, die das charakteristische Signale erzeugt, angefügt werden muß, wird das Polymer als extrinsisch markiert bezeichnet. Die "Markierung" kann beispielsweise lichtemittierend, energieaufnehmend, fluoreszierend, radioaktiv oder dämpfend sein.

[0158] Viele natürlich vorkommende Einheiten eines Polymers sind lichtemittierende Verbindungen oder Dämpfungsmittel. Beispielsweise haben Nukleotide von nativen Nukleinsäuremolekülen unterschiedliche Absorptionsspektren, z. B. haben A, G, T, C und U Absorptionsmaxima bei 259 nm, 252 nm, 267 nm, 271 nm beziehungsweise 258 nm. Modifizierte Einheiten, die intrinsische Markierungen beinhalten, können ebenfalls in das Polymer aufgenommen sein. Ein Nukleinsäuremolekül kann zum Beispiel jede der folgenden modifizierten Nukleotid-Einheiten beinhalten, die die charakteristischen Energieemissionsmuster einer lichtemittierenden Verbindung oder einer dämpfenden Verbindung aufweisen: 2,4-Dithiouracil, 2,4-Diselenouracil, Hypoxanthin, Mercaptopurin, 2-Aminopurin und Selenopurin.

[0159] Eine Einheit kann auch als intrinsisch markiert angesehen werden, wenn eine andere Eigenschaft der Einheit als die lichtemittierende, dämpfende oder radioaktive Eigenschaft eine Information über die Identität der Einheit ohne die Zugabe einer extrinsischen Markierung bereitstellt. Beispielsweise kann die Gestalt und Ladung der Einheit eine Information über die Einheit bereitstellen, die dann zu einem bestimmten charakteristischen Signale führen kann, wie einer Änderung in der Leitfähigkeit, die aus der Blockade eines Leitungsweges durch die Einheit resultiert.

[0160] Wenn eine extrinsische Markierung zur Verwendung gemäß den erfindungsgemäßen Verfahren ausgewählt wird, hängt die Art der ausgewählten extrinsischen Markierung von verschiedenen Faktoren ab, einschließlich der Natur der Analyse, die durchgeführt wird, der Art des Mittels und der Art des Polymers. Extrinsische Markerverbindungen, schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf lichtemittierende Verbindungen, dämpfende Verbindungen, radioaktive Verbindungen, Spin-Marker und Schwermetallverbindungen. Die Markierung sollte sterisch kompatibel und chemisch kompatibel zu den Einheiten des zu analysierenden Polymers sein.

[0161] Eine "lichtemittierende Verbindung" wie hier verwendet ist eine Verbindung, die Licht als Antwort auf Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Diese Verbindungen sind in der Lage, Licht mittels Phosphoreszenz, Chemilumineszenz, Lumineszenz, polarisierter Fluoreszenz, Szintillatoren oder, besonders bevorzugt, Fluoreszenz zu absorbieren und zu emittieren. Die ausgewählte bestimmte lichtemittierende Verbindung hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab, die in größerer Ausführlichkeit unten diskutiert werden. Lichtemittierende Verbindungen sind ausführlich in der Literatur beschrieben worden. Haugland, R. P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6. Aufl., Molecular Probes, Inc., 1996, durch Inbezugnahme hier aufgenommen, gibt zum Beispiel eine Beschreibung von lichtemittierenden Verbindungen.

[0162] Radioaktive Verbindungen sind Substanzen, die Alpha-, Beta- oder Gamma-Kernstrahlung emittieren. Alphastrahlen sind positiv geladene Partikel der Massenzahl 4 und werden leicht durch elektrische und magnetische Felder abgelenkt. Betastrahlen sind negativ geladene Elektronen und werden stark durch elektrische und magnetische Felder abgelenkt. Gammastrahlen sind Photonen von elektromagnetischer Strahlung und werden durch elektrische und magnetische Felder nicht abgelenkt und weisen eine Wellenlänge in der Grö-

ßenordnung von 10^{-3} bis 10^{-9} cm auf.

[0163] Im allgemeinen sind fluoreszierende Farbstoffe Kohlenwasserstoffmoleküle mit einer Kette von mehreren konjugierten Doppelbindungen. Die Absorptions- und Emissionswellenlängen eines Farbstoffs sind ungefähr proportional zu der Anzahl von Kohlenstoffatomen in den konjugierten Ketten. Eine bevorzugte fluoreszierende Verbindung ist "Cy-3" (Biological Detection Systems, Pittsburgh, PA). Andere bevorzugte fluoreszierende Verbindungen, die für die vorliegende Erfindung geeignet sind, beinhalten, sind aber beschränkt auf Fluoresceinisothiocyanat ("FITC"), Texas-Rot, Tetramethylrhodaminisothiocyanat ("TRITC"), 4,4-Difluor-4-bora-3a- und 4a-Diaza-s-indacen ("BODIPY").

[0164] Chemilumineszierende Verbindungen sind Verbindungen, die aufgrund einer chemischen Reaktion lumineszieren. Phosphoreszierende Verbindungen sind Verbindungen, die eine verzögerte Lumineszenz als Ergebnis der Absorption von Strahlung aufweisen. Lumineszenz ist eine nicht-thermische Emission von elektromagnetischer Strahlung durch ein Material bei Anregung. Diese Verbindungen sind in der Fachwelt gut bekannt und von einer Vielzahl von Quellen erhältlich.

[0165] In einer Ausführungsform der Erfindung ist die lichtemittierende Verbindung ein Donor- oder ein Akzeptor-Fluorophor. Ein Fluorophor wie hier verwendet ist ein Molekül, das in der Lage ist, Licht einer Wellenlänge zu absorbieren und Licht einer anderen Wellenlänge zu emittieren. Ein Donor-Fluorophor ist ein Fluorophor, der in der Lage ist, seine Fluoreszenzenergie auf ein Akzeptormolekül in unmittelbarer Nähe zu übertragen. Ein Akzeptor-Fluorophor ist ein Fluorophor, der Energie von einem Donor in unmittelbarer Nähe aufnehmen kann. (Ein Akzeptor eines Donor-Fluorophors muß kein Fluorophor sein. Es kann auch eine nicht-fluoreszierende Verbindung sein). Fluorophore können photochemisch in einen angeregten Zustand oder auf ein höheres Energieniveau angehoben werden, indem man sie mit Licht bestrahlt. Anregungswellenlängen liegen im allgemeinen im UV-, blauen oder grünen Bereich des Spektrums. Die Fluorophore verbleiben für eine sehr kurze Zeitdauer in dem angeregten Zustand, bevor sie ihre Energie abgeben und in den Grundzustand zurückkehren. Solche Fluorophore, die ihre Energie als emittiertes Licht abgeben, sind Donor-Fluorophore. Die Wellenlängenverteilung der abgegebenen Photonen bildet das Emissionsspektrum, das einen Höhepunkt (niedrigere Energien) bei längeren Wellenlängen zeigt als das Anregungsspektrum, jedoch für ein bestimmtes Fluorophor gleichermaßen charakteristisch ist.

[0166] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist die Einheit mit einer radioaktiven Verbindung markiert. Die radioaktive Verbindung emittiert Kernstrahlung, wenn sie das Mittel oder die Station passiert. Wenn das Mittel eine Szintillationsschicht ist, wechselwirkt die Kernstrahlung mit der Szintillationsschicht und verursacht eine Fluoreszenzanregung.

[0167] Ein Fluoreszenzsignal, das für die radioaktiv markierte Einheit indikativ ist, wird dann detektiert.

[0168] Extrinsische Markierungen können zu dem Polymer durch jedes Mittel hinzugefügt werden, das im Stand der Technik bekannt ist. Zum Beispiel können die Marker direkt an das Polymer angeheftet werden oder an einen Linker angeheftet werden, der an das Polymer angeheftet wird. Zum Beispiel sind Fluorophore direkt durch chemische Mittel in Nukleinsäuren eingebaut worden, sind aber in Nukleinsäuren auch durch aktive Amino- oder Thiogruppen in einer Nukleinsäure eingeführt worden. Proudnikov und Mirabekov, *Nucleic Acids Research*, 24: 4535–4532 (1996). Modifizierte Einheiten, die chemisch leicht derivatisiert werden können, oder die Linker beinhalten, können in das Polymer eingebaut werden, um diesen Prozeß zu fördern. Eine ausführliche Beschreibung von Modifikationsverfahren, die bei dem Polymer, dem Linker und/oder dem extrinsischen Marker durchgeführt werden können, um ein Biokonjugat herzustellen, können in Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, Inc., San Diego, 1996, hier durch Inbezugnahme aufgenommen, gefunden werden.

[0169] Es gibt mehrere bekannte Verfahren zur direkten chemischen Markierung von DNA (Hermanson, 1996; Roget et al., 1989; Proudnikov und Mirzzbekov, 1996). Eines dieser Verfahren beruht auf der Einführung von Aldehydgruppen durch partielle Depurinierung von DNA. Fluoreszenzmarker mit einer angehefteten Hydrazingruppe werden effizient mit den Aldehydgruppen gekoppelt und die Hydrazonbindungen werden stabilisiert durch Reduktion mit Natrium Markierungseffizienzen um 60%. Die Reaktion von Cytosin mit Bisulfit in Gegenwart eines Überschusses eines Amin-Fluorophors führt zur Transaminierung an der N₄-Position (Hermanson, 1996). Reaktionsbedingungen wie pH, Amin-Fluorophor-Konzentration und Inkubationszeit und Temperatur beeinflussen den Ertrag von gebildeten Produkten. Bei hohen Konzentrationen des Amin-Fluorophors (3M) kann die Transaminierung einen Ertrag von 100% erreichen (Draper und Gold, 1980).

[0170] Lichtemittierende Verbindungen können durch jede Art Mechanismus, die im Stand der Technik bekannt ist, an Polymere oder andere Materialien angeheftet werden. Beispielsweise beinhalten funktionelle Gruppen, die mit verschiedenen lichtemittierenden Gruppen reagieren, sind aber nicht beschränkt auf (funktionelle Gruppe: reaktive Gruppe einer lichtemittierenden Verbindung): aktivierte Ester: Amine oder Aniline; Acylazid: Amine oder Aniline; Acylhalide: Amine, Aniline, Alkohole oder Phenole; Acylnitrile: Alkohole oder Phenole; Aldehyde: Amine oder Aniline; Alkylhalide: Amine, Aniline, Alkohole, Phenole oder Thiole; Alkylsulfonate: Thiole, Alkohole oder Phenole; Anhydride: Alkohole, Phenole, Amine oder Aniline; Arylhalide: Thiole; Aziridin: Thiole oder Thioether; Carboxylsäure: Amine, Aniline, Alkohole oder Alkylhalide; Diazoalkan: Carboxylsäuren; Epoxid: Thiole; Haloacetamid: Thiole; Halotriazin: Amine, Aniline oder Phenole; Hydrazin: Aldehyde oder Ketone; Hydroxyamin: Aldehyde oder Ketone; Imidoester: Amine oder Aniline; Isocyanat: Amine oder Aniline; und Isothiocyanat: Amine oder Aniline.

[0171] Das Mittel, das mit der Einheit des Polymers reagiert, ist ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle. Wie hier verwendet, ist "elektromagnetische Strahlung" Energie, die durch elektromagnetische Wellen gebildet wird. Die elektromagnetische Strahlung kann in Form einer direkten Lichtquelle vorliegen oder kann durch eine lichtemittierende Verbindung wie beispielsweise ein Donor-Fluorophor emittiert werden. Wie hier verwendet, beinhaltet "Licht" elektromagnetische Energie jeder Wellenlänge einschließlich sichtbarem, infrarotem und ultraviolettem Licht.

[0172] Wie hier verwendet, ist eine Dämpfungsquelle eine Einheit, die eine Eigenschaft einer lichtemittierenden Quelle verändert, oder die in der Lage ist, diese zu verändern.

[0173] Eine Fluoreszenzanregungsquelle wie hier verwendet ist eine Einheit, die in der Lage ist, zu fluoreszieren oder Photonenemissionen zu verursachen (d. h. elektromagnetische Strahlung, ein gerichtetes elektrisches Feld, Temperatur, Fluoreszenz, Strahlung, Szintillation, körperlicher Kontakt oder mechanische Unterbrechung).

[0174] Wenn eine Einheit des Polymers dem Mittel gegenüber ausgesetzt wird, erzeugt die Wechselwirkung zwischen den beiden ein Signal. Das Signal stellt Informationen über das Polymer bereit. Beispielsweise, wenn alle Einheiten eines bestimmten Typs, zum Beispiel alle Alanine, eines Proteinpolymers mit einer bestimmten lichtemittierenden Verbindung markiert sind (intrinsisch oder extrinsisch), dann zeigt das Signal an, daß ein Alanin an einer bestimmten Position eines Polymers vorhanden ist, wenn ein Signal detektiert wird, das charakteristisch für die lichtemittierende Einheit ist. Wenn jede Art von Einheit, zum Beispiel jede Art von Aminosäure, mit einer anderen lichtemittierenden Verbindung markiert ist, die ein eindeutiges Lichtemissionsmuster aufweist, wird jede Aminosäure mit dem Mittel in einer Weise wechselwirken, daß ein bestimmtes Signal erzeugt wird. Durch Bestimmen, was jedes Signal für jede Einheit des Polymers ist, kann die Sequenz der Einheiten festgestellt werden.

[0175] Die Wechselwirkung zwischen der Einheit und dem Mittel kann verschiedene Formen annehmen, erfordert aber nicht, daß die Einheit und das Mittel körperlichen Kontakt zueinander haben. Beispiele für Wechselwirkungen sind wie folgt. Eine erste Art Wechselwirkung beinhaltet, daß das Mittel elektromagnetische Strahlung und die Einheit des Polymers eine lichtemittierende Verbindung ist (entweder intrinsisch oder extrinsisch mit einer lichtemittierenden Verbindung markiert). Wenn die lichtemittierende Verbindung mit elektromagnetischer Strahlung (wie beispielsweise einem Laserstrahl einer geeigneten Wellenlänge oder elektromagnetischer Strahlung, die von einem Donor-Fluorophor abgegeben wird) in Kontakt gebracht wird, veranlaßt die elektromagnetische Strahlung die lichtemittierende Verbindung, elektromagnetische Strahlung einer bestimmten Wellenlänge zu emittieren. Das Signal wird dann gemessen. Das Signal zeigt ein charakteristisches Lichtemissionsmuster und zeigt auf diese Weise, daß eine bestimmte markierte Einheit des Polymers anwesend ist. In diesem Fall wird von der Einheit des Polymers gesagt, daß sie "die Emission der elektromagnetischen Strahlung von der lichtemittierenden Verbindung detektierbar beeinflusst".

[0176] Eine zweite Art von Wechselwirkung beinhaltet, daß das Mittel eine Fluoreszenzanregungsquelle und die Einheit des Polymers eine lichtemittierende oder eine radioaktive Verbindung ist. Wenn die lichtemittierende Einheit mit der Fluoreszenzanregungsquelle in Kontakt gebracht wird, veranlaßt die Fluoreszenzanregungsquelle die lichtemittierende Verbindung, elektromagnetische Strahlung einer bestimmten Wellenlänge zu emittieren. Wenn die radioaktive Einheit mit der Fluoreszenzanregungsquelle in Kontakt gebracht wird, veranlaßt die Kernstrahlung, die von der Einheit emittiert wird, die Fluoreszenzanregungsquelle, elektromagnetische Strahlung einer bestimmten Wellenlänge zu emittieren. Das Signal wird dann gemessen.

[0177] Eine Variante dieser Arten von Wechselwirkungen beinhaltet die Anwesenheit eines dritten Elements der Wechselwirkung, eine benachbarte Verbindung, die an der Erzeugung des Signals beteiligt ist. Zum Beispiel kann eine Einheit mit einer lichtemittierenden Verbindung markiert sein, die ein Donor-Fluorophor ist und eine benachbarte Verbindung kann ein Akzeptor-Fluorophor sein. Wenn die lichtemittierende Verbindung in einen angeregten Zustand versetzt wird und in Nachbarschaft zu dem Akzeptor-Fluorophor gebracht wird, wird ein Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor auftreten, wobei ein Signal erzeugt wird, das als Maß für die Anwesenheit der lichtemittierenden Einheit detektiert werden kann. Die lichtemittierende Verbindung kann durch Aussetzen gegenüber Licht (wie beispielsweise einem Laserstrahl) oder oder indem sie einer Fluoreszenzanregungsquelle ausgesetzt wird, in den "angeregten" Zustand versetzt werden.

[0178] Eine andere Wechselwirkung beinhaltet eine benachbarte Verbindung, die eine Dämpfungsquelle ist. In diesem Fall wird die lichtemittierende Verbindung veranlaßt, elektromagnetische Strahlung durch Aussetzen gegenüber Licht zu emittieren. Wenn die lichtemittierende Verbindung in der Nähe zu einer Dämpfungsquelle angeordnet ist, wird das Signal von der lichtemittierenden Einheit verändert werden.

[0179] Parallel zu den oben beschriebenen kann eine Gruppe von Wechselwirkungen erzeugt werden, wobei die lichtemittierende Verbindung jedoch die benachbarte Verbindung und die Einheit entweder eine Dämpfungsquelle oder eine Akzeptorquelle ist.

[0180] In diesen Fällen ist das Mittel elektromagnetische Strahlung, die durch die benachbarte Verbindung emittiert wird, und das für die Wechselwirkung zwischen der Einheit und einer solchen Strahlung charakteristische Signal wird dadurch erzeugt, daß die Einheit in Wechselwirkungsnähe mit der benachbarten Verbindung gebracht wird.

[0181] Die Mechanismen, durch die jede dieser Wechselwirkungen ein detektierbare Signal erzeugen, sind im Stand der Technik bekannt. Zu Beispielzwecken sind Mechanismen, durch die ein Donor- und Akzeptor-Fluorophor gemäß der Erfindung wechselwirken, um ein detektierbare Signal zu erzeugen, unten beschrieben, einschließlich als Ergebnis dieser Art von Wechselwirkung bekannter praktischer Beschränkungen sowie Verfahren zur Minderung oder Eliminierung dieser Beschränkungen.

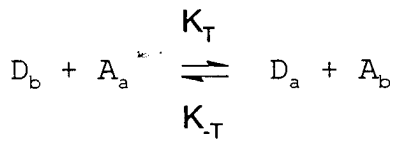
[0182] In einer bevorzugten Ausführungsform resultiert das durch die Wechselwirkung zwischen der Einheit und dem Mittel erzeugte Signal aus einem Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) zwischen Fluorophoren. Entweder die Einheit oder die/das benachbarte Verbindung/Mittel können mit entweder dem Donor- oder Akzeptor-Fluorophor markiert sein. FRET ist der Transfer von Photonenenergie zwischen Fluorophoren. FRET ist vielversprechend als Werkzeug zur Charakterisierung molekularer Details, weil es in der Lage ist, Abstände zwischen zwei Punkten, die 10 Å bis 100 Å auseinanderliegen, zu messen. Die Ångström-Auflösung von FRET ist in vielen Untersuchungen molekularer Prozesse und biophysikalische Phänomene verwendet worden (für Übersichten siehe Clegg, 1995; Clegg, 1992; Selvin, 1995; sowie Wu und Brand, 1994). Die Auflösungsstärke von FRET stammt daher, daß der Energietransfer zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor umgekehrt von der sechsten Potenz des Abstand zwischen den Sonden abhängig ist. In der Praxis ist diese Auflösung um eine Größenordnung besser als bei dem höchstauflösenden Elektronenmikroskop.

[0183] Um einen FRET durchzumachen, überlagert das Emissionsspektrum des Donors das Anregungsspektrum des Akzeptors. Die Einheit des Polymers wird spezifisch mit einem Akzeptor-Fluorophor markiert. Das Mittel ist ein Donor-Fluorophor. Ein Laser wird auf die Anregungswellenlänge des Donor-Fluorophors eingestellt. Wenn das Polymer durch den Kanal bewegt wird, emittiert der Donor-Fluorophor seine charakteristische Wellenlänge. Wenn der Akzeptor-Fluorophor sich in Wechselwirkungsnähe zu dem Donor-Fluorophor bewegt, wird das Akzeptor-Fluorophor durch die Energie von dem Donor-Fluorophor angeregt. Die Folge dieser Wechselwirkung ist, daß die Emission des Donor-Fluorophors gedämpft wird und die des Akzeptor-Fluorophors verstärkt wird.

[0184] Um ein optimal effizientes FRET-Signal zur Detektion zu erzeugen, sollten zwei Bedingungen erfüllt sein. Die erste Bedingung ist eine effiziente Donor-Emission in Abwesenheit des Akzeptors. Die zweite ist die effiziente Erzeugung einer Änderung entweder in der Donor- oder Akzeptor-Emission während des FRET.

[0185] In einem Modellsystems können sowohl der Donor-Fluorophor als auch der Akzeptor Fluorophor unbegrenzt Photonenemission verursachen. Unter solchen Umständen ist die Abnahme der Donor-Emission während des Energietransfers gleich dem Anstieg der Akzeptor-Emission. In anderen Worten, die Emissionsänderung ist identisch für den Donor und den Akzeptor. Dies ist so, da für jedes Donoremissionsdämpfungsereignis ein entsprechendes und entgegengerichtetes Akzeptoremissionsereignis vorhanden ist. Cantor und

Schimmel, 1980, geben einen guten Überblick über dieses Modellsystem. Gegeben sei ein System von zwei Fluorophoren, einem Donor und einem Akzeptor. In einem Bereich innerhalb Förster-Distanz tritt eine sehr schwache Kopplung auf. Die Wechselwirkung zwischen dem Donor und dem Akzeptor wird zusammengefaßt als:



wobei D_a und A_a die Grund-Singulett-Zustände und D_b und A_b die ersten angeregten Singulett-Zustände sind. k_T und k_{-T} sind die Vorwärts- und Rückwärtsraten des Energietransfers. Die obige Reaktion besagt, das ein gegebener Donor im ersten angeregten Zustand Energie leicht durch interne Umwandlung verliert, bis er seinen Grundzustand, D_a , erreicht. Da die Akzeptor-Absorptionsenergien mit den Donor-Emissionsenergien überlappen, tritt eine sehr schwache Kopplung auf, die es erlaubt, daß ein Resonanzenergietransfer stattfindet.

[0186] Als Folge des Energietransfers befinden sich sowohl der Donor (D_b) als auch der Akzeptor (A_b) in angeregten Schwingungszuständen. Schwingungsrelaxation bringt sie in die entsprechenden Grundanregungszustände. Die Schwingungsrelaxation der Anregung ist sehr effizient, wobei die durchschnittliche Lebensdauer eines angeregten Erregungszustands nur etwa 10^{-15} s beträgt (Skoog et al., 1992). Die interne Umwandlung für fluoreszierende Moleküle beträgt auf der anderen Seite etwa 10^{-9} s. Der Unterschied in diesen Geschwindigkeiten bedeutet, daß selbst dann, wenn k_T sehr effizient ist, es unwahrscheinlich ist, daß die umgekehrte Reaktion (k_{-T}) auftritt. In diesem idealen System ergibt sich daher eine Verschiebung der relativen Population von angeregten Donoren und Akzeptoren.

[0187] Die obige Analyse beschreibt ein System, bei dem ein einzelner Akzeptor und ein einzelner Donor verwendet werden. Dieselbe Art Wechselwirkung kann bei einem System durchgeführt werden, das viele Donoren und einen Akzeptor verwendet. Wann immer der Akzeptor sich in seinem Grund-Singulett-Zustand (A_a) befindet, kann ein Energietransfer stattfinden. Dies bedeutet, daß ein Akzeptor mit einer Lebensdauer von 1 ns 1×10^9 Mal pro Sekunde angeregt werden kann, eine sehr große Rate im Vergleich zu derjenigen eines Donor-Fluorophors bei Standard-Beleuchtung (~ 25.000 Anregungsereignisse/s). Da die maximale Anzahl von Anregungen, die ein Akzeptor durchmachen kann, viel größer ist als diejenige eines Donor-Fluorophors, können mehrere Donoren ihre Energie auf einen Akzeptor übertragen.

[0188] Obwohl Akzeptoranregungen zu höheren Energieniveaus (A_x) und simultane Donor-Abregungsereignisse als ein mögliches Problem angesehen werden könnte, das zur Wechselwirkung mit Signalen führt, die in einem System mit mehreren Donoren und einem einzelnen Akzeptor erzeugt werden, zeigt die folgende Analyse, daß dies nicht der Fall ist. Es ist unwahrscheinlich, daß die Anregung zu höheren Energiezuständen und gleichzeitige Donor-Abregungsereignisse die Signalerzeugung stören.

[0189] Akzeptoranregung zu höheren Niveaus bedeutet, daß theoretisch eine weitere Anregung von dem ersten Singulett-Zustand (A_a) des Akzeptors zu höheren Singulett-Zuständen (A_x) auftreten könnte. Wenn dies in der Tat möglich wäre, dann steigt die maximale Zahl von Anregungsereignissen in einer vorgegebenen Zeit, weil die effektive Lebensdauer kürzer ist. Eine kürzere effektive Lebensdauer ergibt sich, weil der Akzeptor sich nicht mehr abregen muß, um einen Energietransfer durchzumachen. Solche Übergänge in dem Akzeptor können nur dann auftreten, wenn die Absorptionsenergien des Akzeptors für einen Übergang mit den Emissionsenergien des Donors zusammentreffen würden, was im allgemeinen für die meisten Moleküle nicht der Fall ist. In der Folge kann ein Energietransfer zwischen den Donoren und dem Akzeptor nur auftreten, wenn sich der Akzeptor in seinem Grund-Singulett-Zustand befindet.

[0190] In Fällen gleichzeitiger Donor-Abregung kann nur einer der Donoren Energie auf den Akzeptor übertragen. Dies bedeutet, daß der andere Donor nicht gedämpft wird und Strahlung emittiert. Wenn gleichzeitige Ereignisse häufig auftreten, würde das obige Szenario für die Multi-Donor-Dämpfung nicht so genau sein, weil ein Teil der Donoren in der Lage wäre, Photonen zu emittieren. Die folgenden Wahrscheinlichkeitsberechnungen zeigen, daß solche Ereignisse statistisch selten sind, was den Einsatz einer Multi-Donor-Dämpfung unterstützt.

Wahrscheinlichkeit des Auftretens von k gleichzeitigen Donor-Emissionen in einer ns , wobei n die Zahl der Fluorophore ist

$$= P_{n,k} = (P_k) ({}_nC_k)$$

Zahl der Donor-Emissionen, die keinen Energietransfer durchmachen können

$$= (2-1) P_{n,2}t = (3-1) P_{n,3} + \dots + (n-1) P_{n,n}t$$

$$= \sum_{k=2}^{k=n} (k-1) P_{n,k}t$$

[0191] Das Ziel dieser Berechnungen ist es, die Zahl von gleichzeitigen Donor-Abregungsereignissen für eine gegebene Zeitdauer zu berechnen. Diese Zahl ist wichtig, weil der Prozentanteil Donor-Energietransfers umso kleiner ist, je größer die Zahl der überlappenden Ereignisse ist. Zum Beispiel ist es möglich, die Wahrscheinlichkeit herauszufinden, mit der zwei Donor-Emissionen ($k = 2$) in einer Nanosekunde gleichzeitig für vier Fluorophore ($n = 4$; daher $P_{n,k} = P_{4,2}$) auftreten. Jede Emission dauert bei diesem Beispiel eine Nanosekunde und wird durch blaue Kreise in dem Raster gekennzeichnet. Darüber hinaus emittiert jeder Fluorophor durchschnittlich 25.000 Photonen/Sekunde zufällig. Die Variablen sind definiert als n = Zahl der Fluorophore, k = Zahl von gleichzeitigen Donor-Emissionen, P = Wahrscheinlichkeit, C = Kombination, und t = Zeit. Die Wahrscheinlichkeit ($P_{n,k}$) für das gleichzeitige Auftreten von k Ereignissen in einer ns für n Fluorophore ist gleich der Wahrscheinlichkeit (P_k) für k gleichzeitige Ereignisse multipliziert mit der Zahl der möglichen Kombinationen (${}_nC_k$), daß k gleichzeitige Ereignisse für n Fluorophore auftreten können. Die Gesamtzahl von gleichzeitigen Ereignissen ist gegeben als die Summe der Wahrscheinlichkeiten für alle möglichen Werte von gleichzeitigen Ereignissen. Dies ergibt die Wahrscheinlichkeit für die Einheiten von (Zahl von Ereignissen)/ ns . Die Gesamtzahl von Fluorophoren, die gleichzeitig eine Emission durchmachen, ist daher die Wahrscheinlichkeit für eine ns multipliziert mit der gegebenen Zeit (t). Es ist auch erforderlich, die Wahrscheinlichkeit von mehr als zwei oder mehr in einer gegebenen Zeit (t) auftretenden Donor-Emissionen ($P_{4,3}$ und $P_{4,4}$) zu berücksichtigen. Aus dieser Information kann die Zahl der Donor-Fluorophore, die aufgrund gleichzeitiger Abregung keinen Energietransfer durchmachen können, abgeleitet werden.

[0192] Die Wahrscheinlichkeit für zwei gleichzeitige Donor-Emissionen in einer Nanosekunde für vier Fluorophore ist gegeben als:

$$P_{n,k} = P_{4,2} = (P_k) ({}_nC_k) = P_k \frac{n!}{k! (n-k)!} = \left(\frac{25000}{10^9}\right)^2 \left(\frac{4!}{2!2!}\right) = 3,75 \times 10^{-9}$$

[0193] Die Wahrscheinlichkeit, daß eine ns eine Emission beinhaltet, beträgt $25.000/10^9$. Die Wahrscheinlichkeit, daß zwei Emissionen in derselben Nanosekunde auftreten, ist das Quadrat ($25.000/10^9$). Da vier verschiedene Fluorophore vorhanden sind, ergeben sich 6 verschiedene mögliche Kombinationen, die gleichzeitige Emissionen erzeugen können ($4!/2!2!$). Diese Werte multipliziert ergeben $3,75 \times 10^{-9}$ Ereignisse/ ns . Dieser Wert multipliziert mit 10^9 ns ergibt $3,75$ Ereignisse/s. In diesem Fall gibt es zwei Emissionen/Ereignis ($k = 2$) und eine davon ($k - 1$) kann keinen Energietransfer durchmachen, so daß die Gesamtzahl von Donor-Emissionen, die keinen FRET durchmachen, $3,75$ Ereignisse/s beträgt.

[0194] Die obige einfache Rechnung kann auf ein System mit einer größeren Zahl von Fluorophoren angewendet werden. In diesem Fall werden eintausend Fluorophore angenommen ($n = 1000$). In ähnlicher Weise wird $P_{1000,2}$ zu $3,122 \times 10^{-4}$ Ereignisse/ ns errechnet. Die Zahl der Donor-Emissionen, die keinen Energietransfer durchmachen können, beträgt $3,122 \times 10^5$. In einigen Fällen können drei gleichzeitige Donor-Emissionen auftreten. Die Wahrscheinlichkeit für diese Ereignisse ($P_{1000,3}$) wird wie folgt berechnet:

$$= \left(\frac{25000}{10^9}\right)^3 \left(\frac{1000!}{3!997!}\right) = 2,596 \times 10^{-6}$$

[0195] Die Anzahl der Donor-Emissionen, die nicht auftreten können, beträgt $(3 - 1)(10^9)(2,596 \times 10^{-6})$ oder $5,192 \times 10^3$. In gleicher Weise müssen Berechnungen für vier gleichzeitige Emissionen oder mehr in die Netto-Zahl von Donor-Fluorophoren einbezogen werden, die keinen Energietransfer durchmachen können. Diese Zahl wird in der folgenden Gleichung ausgedrückt:

$$= (2-1) P_{n,2}t = (3-1) P_{n,3} + \dots + (n-1) P_{n,n}t = \sum_{k=2}^{k=n} (k-1) P_{n,k}t$$

[0196] Die Auflösung dieser Gleichung ergibt $3,174 \times 10^5$ Donor-Emissionen, die keinen Energietransfer durchmachen. Diese Donor-Emission wird aus den folgenden Werten errechnet: 25.000 Photonen/s pro Fluorophore

rophor, 1000 Fluorophore und 1 Sekunde Zeitintervall. Dies bedeutet, daß $2,5 \times 10^7$ Photonen pro Sekunde emittiert werden. Die Schlußfolgerung ist, daß 98,7% der Donor-Ereignisse einen Energietransfer durchmachen kann.

[0197] Die Schlußfolgerung aus der obigen Diskussion eines Multidonor-/Einfachakzeptor-Systems ist, daß ein Akzeptor einen Energietransfer mit mehreren Donoren durchmachen kann. Die in Betracht gezogenen Beschränkungen waren die Möglichkeit, einen Akzeptor zu höheren Energieniveaus anzuregen und auch die Beschränkungen simultaner Donor-Abregung. Bei Donor-Emissionen, die gleichzeitig auftreten, wäre nur eine der Abregungen in der Lage, einen Energietransfer mit dem Akzeptor durchzumachen. Wenn dies oft auftritt, würde der Akzeptor nicht in der Lage sein, einen Energietransfer mit allen Donor-Emissionsereignissen durchzumachen. Wahrscheinlichkeitsberechnungen zeigen, daß für ein Tausend-Donoren-/ein-Akzeptor-System unter üblichen Epiilluminationsbedingungen 98,7% der Donor Emissionsereignisse einen Energietransfer mit einem Akzeptor durchmachen können. Nach allem ist die Schlußfolgerung aus dieser detaillierten Analyse die, daß ein Multidonor-System/Einfachakzeptor-System in der Tat existieren kann und daß ein einzelner Akzeptor einen Energietransfer mit einer großen Zahl von Donor-Molekülen durchmachen kann.

[0198] Die folgende Beschreibung führt aus, wie die Bedingungen für die Donor- und Akzeptor-Fluorophore des Multidonor-/Einfachakzeptor-Systems optimiert werden können. Um das System zu optimieren, sollten zwei potentielle Probleme, die auftreten können, wenn das System tatsächlich ausgeführt wird, in Betracht gezogen werden. Dies sind Photobleichung und Lösungsmittel-Quenching (Rost, 1990; Menter et al., 1978; Giloh und Sedat, 1982; Vaughan und Weber, 1970; Guilbault, 1973; Udenfriend 1962; Pringsheim, 1963). Diese Effekte können die Zahl der Anregungszyklen begrenzen, die ein Fluorophor durchlaufen kann. Während ein Fluorophor in einem idealen System eine unendliche Zahl von Anregungszyklen durchmachen kann, ist die tatsächliche Zahl der Zyklen in der Praxis auf eine endliche Zahl in Abhängigkeit sowohl der Lösungsmittelbedingungen und der Intensität des Anregungslichts begrenzt. Das in einem Multidonor/Einfachakzeptor-System erzeugte Signal kann jedoch unter bestimmten experimentellen Bedingungen optimiert werden.

[0199] Die Theorie für die Optimierung und Erzeugung eines wirksamen Signals folgt. Das Grundprinzip besteht darin, daß Signale erzeugt werden, solange die Modellbedingungen so nahe wie möglich simuliert werden. Zur Erinnerung sei darauf hingewiesen, daß Fluorophore eine unendliche Anzahl von Anregungszyklen durchmachen können. Wenn wirkliche Fluorophore sich in einer ähnlichen Weise verhalten, kann jede Zahl von Fluorophoren festgestellt werden, solange die zeitliche Integration der Photonenemissionen ausreichend ist. Ein Verfahren, nahezu ideale Bedingungen zu erreichen, besteht darin, Fluorophore in einem festen Medium zu immobilisieren. Das Einbetten von Fluorophoren in feste Medien kann sowohl Photobleichung als auch Dämpfung (Quenching) beseitigen (Haughland, 1996; Garland und Moore, 1979; Rost, 1991) und daß bestimmte Arten von Fluorophoren besonders stabil sind (wie beispielsweise Ferulasäure in Pflanzenzellwänden, Uranylglas, und Acriflavin) (Rost, 1991). Dies erhöht die Zahl der möglichen Anregungszyklen drastisch. Obwohl die Fluorophore in einem festen Medium eingebettet sind, können sie über mehrere Stunden Fluoreszenzsignale erzeugen (Rost, 1991) und können weiterhin einen FRET mit Akzeptoren durchmachen (Stryer, 1978; Cantor und Schimmel, 1980) und umgekehrt. Darüber hinaus ist bekannt, daß der Akzeptor für mehrere Stunden einen Resonanzenergietransfer mit Donoren unter Lösungsmittelbedingungen durchmachen kann (Wittwer, 1997; Lee et al., 1994; Uchiyama et al., 1996; Livak et al., 1997). Die Fähigkeit eines Akzeptors, einen Donor zu dämpfen, der ein stabiles Signal aufweist, verändert sich zu der Fähigkeit, hocheffiziente Signale zu erzeugen.

[0200] Es ist bekannt, daß ein Akzeptor unter Lösungsmittelbedingungen mit einem Donor für eine verlängerte Zeitdauer einen Energietransfer durchmachen kann (Wittwer, 1997; Lee et al., 1994; Uchiyama et al., 1996; Livak et al., 1997). Der Beweis ergibt sich aus Versuchen, die zu Peptid- und Nukleinsäurespaltungstests durchgeführt wurden. Bei diesen Tests wird ein bestimmtes Substrat an beiden Enden mit einem Donor- und einem Akzeptor-Fluorophor markiert. Da die Länge des Substrats innerhalb der Förster-Distanz des Donor-Akzeptor-Paares liegt, wird die Fluoreszenz des Donors gedämpft. Die Überwachung der Donor-Fluoreszenz ermöglicht einen auf Licht beruhenden Spaltungstest. Auf diese Weise ist ein Anstieg der Donor-Fluoreszenz direkt proportional zur Spaltungsaktivität des bestimmten Enzyms. Tests dieser Art, gemeinhin als fluorometrische Spaltungstests bezeichnet, sind verwendet worden, um eine Anzahl von Systemen zu untersuchen, einschließlich HIV-Proteasen (Matayoshi et al., 1990; Toth und Marshall, 1990), neutrale Proteasen (Ng et al., 1989), EcoRV-Restriktionsendonukleasen (Erskine und Halford, 1994), PaeR7-Endonuklease (Ghosh et al., 1994), DNA-Polymerase-I-5'-3'-Exonukleaseaktivität (Wittwer et al., 1997; Livak, 1997), Thermolysin (Yang und Van Wart, 1994), und Papain (Garcia-Echeverria und Rich, 1992). Die Bedeutung dieser Versuche ist wichtig, weil sie Hinweise beinhalten, daß ein Akzeptor einen Donor für verlängerte Zeitspannen dämpfen kann. Die Kontrollen bei fluorometrischen Spaltungstests beinhalten die Überwachung des ungespaltenen Substra-

tes (in Abwesenheit des Spaltungsenzyms) über die Dauer des Versuchs. Bei besonders langwierigen Experimenten müssen diese Kontrollen über eine längere Zeitspanne überwacht werden. Das Fehlen eines Anstiegs in der Donor-Fluoreszenz bei diesen Kontroll-Versuchen zeigt direkt, daß ein Akzeptor einen Donor über eine signifikant lange Zeit dämpfen kann.

[0201] Der Akzeptor behält seine Fähigkeit, Energie für eine längere Zeitdauer zu transferieren, weil seine Energiezustände unverändert bleiben. Ein Energietransfer tritt auf, wenn die Absorptionsenergien des Akzeptors mit den Emissionsenergien des Donors zusammenfallen. Das Ergebnis des Energietransfers ist eine Umwandlung eines Grund-Singulett-Zustands (A_a) in einen angeregten Singulett-Zustand (A_b). Der Akzeptor verliert Energie durch interne Umwandlung, entweder fluoreszierend oder nichtstrahlend. Die oben zitierten Studien zeigen, daß die Akzeptoren ihre relativen Energieniveaus trotz nicht idealer experimenteller Bedingungen und daher ihre Fähigkeit, einen Energietransfer durchzumachen, behalten.

[0202] Die Zahl der Anregungszyklen, die ein Fluorophor im allgemeinen in einer Lösung durchmacht, beträgt annähernd 35.000 Zyklen (Rost, 1991). Die Zahl der Anregungszyklen von Fluorophoren in Lösung ist jedoch begrenzt durch die oben diskutierten Lösungsmittelleffekte wie beispielsweise Sauerstoffdämpfung, Kollisionsdämpfung und Reaktionen im angeregten Zustand. Die Lösungsmittelbedingungen können so angepaßt werden, daß die Zahl der Anregungszyklen optimiert ist (Haughland, 1996). Verschiedene chemische Verfahren werden eingesetzt, um die Bedingungen für die Detektion von Akzeptor-Fluorophoren zu optimieren. Natriumazid (NaN_3), Natriumiodid (NaI), Dithiothreitol (DTT), Dithioerythritol (DTE), Natriumdithionat, n-Propylgallat, Ascorbinsäure und Polyvinylalkohol (PVA) haben sich sämtlich mit verschiedenen Fluorophoren als wirksam erwiesen (Böck et al., 1985; Johnson et al., 1982; Picciolo und Kaplan, 1984; Gill, 1979; Giloh and Sedat, 1982; Valnes und Brandtzaeg, 1985). B-Mercaptoethanol, Natriumnitroprussid und die Aufnahme von Elektronendonatoren und Molekülen mit SH-Gruppen haben sich auch als wirksam gezeigt (Franklin und Filion, 1985; Spatz und Grabig, 1983; Hamada und Fujita, 1983). Darüber hinaus sind kommerzielle Reagenzien zur Reduktion des Abklingens der Fluoreszenz von Fluorophoren in Lösung erhältlich. Die SlowFade-Formulierung (Molecular Probes, OR) reduziert die Abklingrate von Fluoreszein auf nahezu Null. Da es eine nahezu konstante Emissionsintensität von Fluoreszein bereitstellt, ist das SlowFade-Reagenz besonders nützlich für quantitative Messungen und Anwendungen, die ein konfokales Laserrastermikroskop einsetzen, bei dem die Anregungsintensität extrem und verlängert sein kann. Für ein System unter den vorgeschlagenen optimierten Bedingungen haben sowohl die anfängliche Donor-Emission als auch die Änderung der Donor-Emission in Gegenwart des Akzeptors Effizienzen, die nahe an die idealen Bedingungen herankommen.

[0203] Ein "detektierbares Signal" wie hier verwendet ist jede Art von Signal, das durch konventionelle Technik erfaßt werden kann. Das erzeugte Signal hängt von der Art des Mittels oder der Station sowie der Einheit und der benachbarten Verbindung ab, sofern vorhanden. In einer Ausführungsform ist das Signal elektromagnetische Strahlung, die aus der Lichtemission durch eine markierte (intrinsische oder extrinsische) Einheit des Polymers oder durch die benachbarte Verbindung hervorgerufen wird. In einer anderen Ausführungsform ist das Signal Fluoreszenz, die aus einer Wechselwirkung zwischen einer radioaktiven Emission und einer Szintillationsschicht resultiert. Das detektierte Signal kann zur Analyse in einer Datenbank gespeichert werden. Ein Verfahren zur Analyse der gespeicherten Signale besteht darin, die gespeicherten Signale mit einem Muster von Signalen von einem anderen Polymer zu vergleichen, um die Verwandtschaft der beiden Polymere zu bestimmen. Ein anderes Verfahren zur Analyse des detektierten Signals besteht darin, die detektierten Signale mit einem bekannten Muster von Signalen zu vergleichen, das charakteristisch ist für ein bekanntes Polymer, um die Verwandtschaft des analysierten Polymers mit dem bekannten Polymer zu bestimmen. Der Vergleich der Signale wird unten ausführlicher beschrieben.

[0204] Mehr als ein detektierbares Signal kann detektiert werden. Beispielsweise kann eine erste individuelle Einheit mit dem Mittel oder der Station wechselwirken, um ein erstes detektierbares Signal zu erzeugen und eine zweite individuelle Einheit kann mit dem Mittel oder der Station wechselwirken, um ein zweites detektierbares Signal zu erzeugen, das sich von dem ersten detektierbaren Signal unterscheidet. Dies ermöglicht es, mehr als eine Art von Einheit auf einem einzelnen Polymer zu detektieren.

[0205] Das detektierbare Signal wird an der Station erzeugt. Eine "Station" wie hier verwendet ist ein Bereich, dem gegenüber ein Teil des zu detektierenden Polymers, z. B. die Einheit, exponiert wird, um ein Signal oder einen polymerabhängigen Impuls zu erzeugen. Die Station kann aus jedem Material, einschließlich einem Gas, bestehen. Bevorzugt ist die Station ein nichtflüssiges Material. "Nichtflüssig" hat seine in der Fachwelt übliche Bedeutung. Eine Flüssigkeit ist ein nichtfestes, nichtgasförmiges Material, das gekennzeichnet ist durch die freie Bewegung seiner es ausmachenden Moleküle untereinander, ohne die Tendenz, sich zu trennen. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist die Station ein festes Material. In einer Ausführungsform, wenn die

Einheit mit einem Mittel wechselwirkt, ist die Station eine Wechselwirkungsstation. Die Station kann auch eine Signalerzeugungsstation sein, was in größerer Ausführlichkeit unten beschreiben ist. Eine "Wechselwirkungsstation oder -stelle" wie hier verwendet ist ein Bereich, in dem eine Einheit des Polymers und das Mittel in bezug aufeinander in derartiger Nähe zueinander angeordnet sind, daß sie miteinander wechselwirken können. Die Wechselwirkungsstation für Fluorophore ist beispielsweise jener Bereich, in dem sie nahe genug beieinander sind, daß sie energetisch wechselwirken können, um ein Signal zu erzeugen.

[0206] Die Wechselwirkungsstation ist in einer bevorzugten Ausführungsform ein Bereich eines Nanokanals, bei dem ein ortsgebundenes, an der den Kanal bildenden Wand angeheftetes Mittel, wie beispielsweise ein Akzeptor-Fluorophor, mit einem Polymer wechselwirken kann, das den Kanal passiert. Der Punkt, an dem das Polymer den lokalisierten Bereich des Mittels passiert, ist die Wechselwirkungsstation. Beim Passieren jeder markierten Einheit des Polymers an dem Mittel vorbei wird ein detektierbares Signal erzeugt. Das Mittel kann auf verschiedene Weise innerhalb des Kanalbereichs lokalisiert sein. Zum Beispiel kann das Mittel in dem Material, das die Wand des Kanals bildet, eingebettet sein, oder das Mittel kann an die Oberfläche des Wandmaterials angeheftet sein. Alternativ kann das Mittel eine Lichtquelle sein, die in einem Abstand von dem Kanal angeordnet ist, jedoch in der Lage ist, Licht durch einen Wellenleiter direkt zu einem Bereich des Kanals zu transportieren. Es kann auch eine Vorrichtung verwendet werden, bei dem mehrere Polymere durch mehrere Kanäle transportiert werden. Diese und andere verwandte Ausführungsformen der Erfindung werden in größerer Ausführlichkeit unten beschrieben. Die Bewegung des Polymers kann durch die Verwendung einer Rinne oder eines Rings zur Führung des Polymers unterstützt werden.

[0207] Andere Anordnungen zur Erzeugung von Wechselwirkungsstationen sind von der Erfindung umfaßt. Zum Beispiel kann ein Polymer durch einen molekularen Motor, der an die Oberfläche einer Wand angebunden ist oder in eine Wand eingebettet ist, vorbeibewegt werden, wobei die Einheiten des Polymers nacheinander an einen bestimmten Ort gebracht werden, bevorzugt in Wechselwirkungsnahe zu einem benachbarten Mittel, wodurch eine Wechselwirkungsstation gebildet wird. Ein molekularer Motor ist eine Verbindung wie beispielsweise eine Polymerase, Helikase oder Aktin, die mit dem Polymer wechselwirkt und entlang der Länge des Polymers an jeder Einheit vorbeitransportiert wird. Gleichmaßen kann das Polymer an der Bewegung gehindert werden und ein Leser kann entlang des Polymers bewegt werden, wobei an dem Leser das Mittel befestigt ist. Zum Beispiel kann das Mittel innerhalb einer Abtastnadel gehalten sein, die entlang der Länge des Polymers geführt wird. Wechselwirkungsstationen werden dann erzeugt, während das Mittel in Wechselwirkungsnahe zu jeder Einheit des Polymers bewegt wird.

[0208] Sobald das Signal einmal erzeugt ist, kann es danach detektiert werden. Die jeweilige Art der Detektionsmittel hängt von der Art des erzeugten Signals ab, welches natürlich von der Art der Wechselwirkung abhängt, die zwischen der Einheit und dem Mittel auftritt. Viele der bei dem erfindungsgemäßen Verfahren beteiligten Wechselwirkungen erzeugen ein Signal aus elektromagnetischer Strahlung. Viele Verfahren zur Detektion von Signalen aus elektromagnetischer Strahlung sind im Stand der Technik bekannt, einschließlich zwei- und dreidimensionalen Bildgebungssystemen.

[0209] Dreidimensionale Bildgebungssysteme zur Darstellung von Fluoreszenz in biologischen Systemen sind kürzlich beschrieben worden. Dickson et al. haben die dreidimensionale Darstellung von einzelnen Molekülen in den Poren eines Gels beschrieben. Dickson et al., Science, 274: 966–969 (1996). Dickson et al. untersuchen die Wirkung von begrenzten Umgebungen auf die Brownsche Bewegung von einzelnen fluoreszierenden Molekülen. Einzelne Moleküle von freiem fluoreszierendem Farbstoff und von an Protein gebundenem fluoreszierendem Farbstoff wurden in Polyacrylamid(PAA)-Gelen eingefangen. Nilrot wurde in das Polyacrylamidgel mit Poren in der Größenordnung von 2 nm eingeschlossen. Die Fluorophor-Gele wurden mit einer evaneszenten Welle angeregt, die durch interne Totalreflektion (TIR) erzeugt wurde, um die Bewegung oder Immobilisation von einzelnen Molekülen innerhalb der Poren des Gels zu detektieren. Das TIR-Verfahren erzeugt dreidimensionale Informationen über die Moleküle in den Poren durch Verwendung des exponentiellen Abfalls in der Anregungsintensität zur Bestimmung des Abstands der Fluorophore von der Grenzfläche. Der Unterschied zwischen der beobachteten Bewegung und der theoretischen Brownschen Bewegung wurde für zwei Fälle untersucht. Die Brownsche Bewegung für freie Fluorophore wurde um einen Faktor von 10^4 reduziert. Die markierten Proteine blieben vollständig stationär im Raum. Im direkten Analogieschluß sollte die räumliche Begrenztheit der Nanokanäle die Brownsche Bewegung der markierten DNA bei der Nanokanal-FRET-Sequenzierung begrenzen oder eliminieren. Dies würde eine stabile und vorhersehbare Passage der DNA durch die Nanokanäle ermöglichen.

[0210] Ein Beispiel für ein gemäß den erfindungsgemäßen Verfahren geeignetes Mikroskopsystem wird von Ishijima et al., Cell, 92: 161–171 (1998) bereitgestellt.

[0211] Zweidimensionale Bildgebungssysteme sind wichtig, weil sie, unter anderen Parametern, geringes Rauschen, hohe Quanteneffizienz, angemessene Pixel-zu-Bild-Korrelation und effiziente Verarbeitungszeiten aufweisen. Ein Beispiel für eine zur Detektion von Signalen geeignete Vorrichtung ist ein zweidimensionales Fluoreszenz-Bildgebungssystem, das elektromagnetische Strahlung im Fluoreszenz-Wellenlängenbereich detektiert.

[0212] Es gibt drei Kategorien von Fluoreszenz-Bildgebungsvorrichtungen, die auf der Art des gemessenen Fluoreszenzsignals beruhen, entweder Intensität, Lebensdauer oder Spektren. Intensitätssignale können durch verschiedene Verfahren, einschließlich Ladungskoppelement(CCD)-Kamera, Schmierbildkamera und Siliziumdioden-Arrays eingefangen werden. Von diesen Verfahren ist die CCD-Kamera aufgrund ihrer breiten kommerziellen Anwendbarkeit am weitesten verbreitet. Die Schmierbildkamera bietet eine überlegene zeitliche Auflösung bis herunter zur Femtosekunde. Siliziumdioden-Arrays weisen einen überlegenen Dynamikbereich, Signal-Rausch-Verhältnisse und zeitliche Auflösung (übliche Bildfrequenz bei 1000/s) auf, haben jedoch größere Bildelemente ($25 \mu\text{M} \times 500 \mu\text{M}$ im Gegensatz zu $20 \mu\text{M} \times 20 \mu\text{M}$ für ein CCD). Jede der Vorrichtungen kann mit den erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, CCD-Kameras sind jedoch bevorzugt.

[0213] Lebensdauer- und Spektrum-Bildgebung werden unter Verwendung einer Kombination von Instrumenten, einschließlich gesteuerter Bildverstärker, gepulsten Lasern und CCD-Kameras durchgeführt. Zeitgesteuerte Verfahren, die lebensdauererwandte Verfahren sind, beinhalten die zeitliche Unterscheidung von Fluoreszenz-Signalen von Hintergrund- und Autofluoreszenz. Periasamy et al., hierin durch Inbezugnahme aufgenommen, stellen eine Übersicht der zeitgesteuerten Fluoreszenz-Mikroskopie für die klinische Bildgebung bereit. Periasamy et. al., *Microscopy and Analysis*, 33–35 (1995). Lebensdauer-Bildgebung verwendet Zeitsteuerungs- oder Phasenmodulations-Techniken zur Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer. Spektralbildgebung bestimmt das Emissionsspektrum an jedem Pixel. Zeitgesteuerte und Lebensdauer-Bildgebungstechniken bieten viele Vorteile gegenüber einfacher CCD-Bildgebung, wie beispielsweise bessere Signal-Rausch-Verhältnisse und größere Farbstoffspezifität, und sind daher ebenfalls bevorzugte Vorrichtungen für das erfindungsgemäße Detektionsverfahren.

[0214] Der erste Typ Bildgebungstechnik, Intensitätsbildgebung, beinhaltet im allgemeinen die Verwendung einer CCD- oder ICCD-Kamera zur unabhängigen Erfassung von Intensitätssignalen. Dies ist ein auf Grund seiner Einfachheit geeignetes Verfahren zur Detektion von Signalen nach den erfindungsgemäßen Verfahren. CCD- und ICCD-Kameras können leicht von einer Anzahl von Herstellern bezogen werden (d. h. Photometrics, Hamamatsu, Princeton Instruments).

[0215] CCDs sind zweidimensionale Silizium-Matrizes, die viele als Pixel bezeichnete lichtempfindliche Elemente aufweisen, die elektrische Ladungen halten können, die durch Photonenwechselwirkung hervorgerufen werden. Das Aussetzen des CCDs gegenüber Fluoreszenzphotonenemissionen verursacht die Ansammlung von Ladung in den einzelnen Pixeln. Nachdem die Exposition vollständig ist, werden ganze Reihen von akkumulierter Ladung zu einem seriellen CCD-Register transportiert. In dem seriellen Register werden einzelne Pixelladungspakete zu einem Auslese-Verstärker transportiert, der ein Signal erzeugt, das proportional zu der Ladungsmenge ist. Jede Reihe des CCD wird in gleicher Weise gelesen, bis das Bild erfolgreich in eine zweidimensionale Serie von Signalen konvertiert ist. Der Ladungstransfer zwischen dem CCD und dem seriellen CCD-Register ist extrem effizient (99,9999% Effizienz). Der Ausgabeverstärker erzeugt eine lineare Antwort auf die gemessenen analogen Signale und das Bild wird zwischen 8 und 16 Bit digitalisiert.

[0216] Beim Auslesen der Bildes gibt es zwei Möglichkeiten, die CCD-Kameras gewöhnlich einsetzen, um Bilder zu modifizieren. Es handelt sich hierbei um "Subarray"-Auslesung und Klasseneinteilung ("Binning"), oder Ladungsgruppierung. Eine programmierte CCD-Kamera kann Pixel selektiv in einem definierten interessierenden Bereich verarbeiten. Der Vorteil, einen interessierenden Bereich zu definieren, liegt darin, eine schnellere Bildauslesung zu ermöglichen. Die Zeit zur Verarbeitung und Digitalisierung jedes Pixels ist festgelegt, so daß kleinere gewünschte Bereiche höhere Bildraten ermöglichen. Kleinere Bereiche sind bei "Subarray"-Auslesung möglich. Beispielsweise kann ein Bereich von 100×100 Pixeln in einem 1024×1024 -Pixel-CCD mit einer Bildrate von 100 Bildern bei einer Pixel-Lesefrequenz von 1 MHz gelesen werden. Das "Binning", das eine Zusammenführung von kleineren Pixeln zu einem effektiv größeren Pixel für schnellere Auslesezeiten ist, erlaubt auf der anderen Seite die Zusammenführung der Ladung von mehreren Pixeln. Beim "Binning" arbeitet das CCD bei reduzierter Auflösung, um den Dynamikbereich zu erhöhen und eine höhere Bildrate zu ermöglichen. Der Dynamikbereich ist das Verhältnis des größten Signals, das ein CCD linear detektieren kann, zum basalen Ausleserauschen. Zum Beispiel ergibt ein 1024×1024 -Pixel-CCD, das 4×4 "binned" ist, ein Bild von 256×256 , das große Pixel aufweist, die tatsächlich 16mal größer sind als die bei der "unbinned" Version. Das Bild wird auch mit 16facher Rate ausgelesen. Der jeweilige Betriebsmodus des CCDs wird von den Komponenten

der Kamera und einem Wirtsrechner vorgegeben.

[0217] Zum Verständnis der Kontrolle des CCDs, es gibt drei Bestandteile eines typischen CCDs, die beschrieben werden müssen, einschließlich der Kamera-Steuerung, elektronischen Einheit und des Kamerakopfes. Die Steuerung fungiert als intermediärer Prozessor für die Eingabe und Ausgabe zwischen dem Wirtsrechner und der Kamera. Die Steuerung enthält eine Logik, die die Kamera dazu bringt, auf bestimmte Steuerkommandos zu reagieren. Darüber hinaus gibt er auch digitalisierte Pixeldaten an den Computer weiter. Intern weist die Steuerung Sequenzen auf, die für die Koordination der CCD-Phasen und die zeitliche Abstimmung der analogen Verarbeitungseinheiten erforderlich sind. Die elektronische Einheit konvertiert digitale Kommandos in aktive Taktsignale und -sequenzen. Darüber hinaus enthält die Einheit den A/D-Wandler. Digitalisierer von 8 bis 16 Bit werden im allgemeinen benötigt. Der Kamerakopf enthält das CCD und oftmals eine Kühlvorrichtung. Flüssigstickstoff- oder Peltier-Kühlung sind gebräuchlich.

[0218] Bei einem grundlegenden Verständnis für den Betrieb einer CCD-Kamera ist die Leistungsfähigkeit die wichtigste Überlegung für die Kamera. Diese Parameter sind insbesondere Rauschen, Linearität, Quanteneffizienz und zeitliche Auflösung. Es gibt vier Komponenten für das Rauschen, die wichtig sind.

[0219] Dies sind Dunkelstrom, Ausleserauschen, Schrotrauschen und Lampenrauschen. Der Dunkelstrom ist der Leckstrom innerhalb des CCDs. Die Ladung sammelt sich selbst im Dunkeln, daher der Ausdruck. Je niedriger die CCD-Temperatur, desto geringer der Dunkelstrom. Thermoelektrische Kühler oder Flüssigstickstoff können die CCD-Temperatur herabsetzen, um den Dunkelstrom zu verringern. Temperaturen von -120°C können den Dunkelstrom um mehrere Größenordnungen verringern. "Multi-pin phasing" (MPP) ist eine neue CCD-Technologie, die den Dunkelstrom um einen Faktor von 100 und mehr reduzieren kann. Ausleserauschen ist die stochastisch bei höheren Erfassungsraten erzeugte elektrische Ladung, die aus dem Ausgabe-Vorverstärker hervorgeht. Wenn die Erfassungsrate ansteigt, steigt auch das Ausleserauschen an. Das Ausleserauschen kann wesentlich reduziert werden, wenn die Temperatur unter -60°C herabgesenkt wird. Schrotrauschen, gemeinhin auch Photonenrauschen genannt, entsteht durch die Quantennatur des Lichts. Es ist die Quadratwurzel aus dem Photonensignal. Bei niedrigen Lichtniveaus ist das relative Schrotrauschen hoch und überlagert oftmals das gewünschte Signal. Lampenrauschen ist auf die Intensitätsschwankungen in der Beleuchtungsquelle zurückzuführen und kann durch Verwendung stabiler Spannungsversorgungen kontrolliert werden. Das Lampenrauschen wird bei quantitativen Anwendungen von CCD-Kameras sehr oft übersehen.

[0220] Photometrische Linearität wird besonders wichtig bei der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie. Zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Verfahren ist die Sorge um die Linearität nicht übermäßig bedeutsam, weil lineare Operatoren im allgemeinen nicht auf die CCD-Daten angewendet werden. Da der Ladungserzeugungsmechanismus bei einem CCD intrinsisch linear ist, ist das Ausgabesignal präzise proportional zur Ladung. Die Elektronik zwischen dem CCD und dem Digitalisierer stellt Raum für Abweichungen bereit. CCDs für wissenschaftliche Einsatzzwecke zeigen Linearität mit weniger als 0,1% Abweichung. In den meisten Fällen ist die Linearität schwer zu messen, da sie linearer ist als die Techniken, die verwendet werden, um sie zu untersuchen.

[0221] Die Quanteneffizienz ist der Anteil der das CCD erreichenden Photonen, der durch Wechselwirkung Elektronen-Loch-Paare in dem CCD erzeugt. Die Quanteneffizienzen reichen von 10% bei CCDs geringer Qualität bis zu 80% bei rückseitenbeleuchteten ("back-illuminated") CCDs für wissenschaftliche Anwendungen. Es existieren auch spektrale Abweichungen der Quanteneffizienz, mit Peaks, die üblicherweise bei sichtbaren Wellenlängen auftreten. Rückseitenbeleuchtete CCDs weisen sehr viel größere Quanteneffizienzen an allen Spektrenstellen auf.

[0222] Die zeitliche Auflösung einer CCD-Kamera wird wichtig bei der Diskussion der möglichen Bildrate der Kamera. Die Expositionszeiten variieren für eine gegebene Anwendung und die Expositionszeit kann durch die Zahl der verwendeten Fluorophore und die Intensität des Anregungslichts eingestellt werden. Die Beschränkung der zeitlichen Auflösung bei einer gegebenen CCD-Kamera ist eine Funktion der Betriebsfrequenz des Analog/Digital-Wandlers und auch der Bildgröße. Zum Beispiel kann ein A/D-Wandler, der bei 1 MHz arbeitet, 100 Bilder eines 100-x-100-Bildes in einer Sekunde auslesen. Darüber hinaus ist die Lesefrequenz umso langsamer, je höher der gewünschte Dynamikbereich ist. Zum Beispiel ist es schwierig für eine gegenwärtige CCD-Kamera, die bei 14 Bit pro Pixel digitalisiert, oberhalb von 1 MHz zu arbeiten. Die Verwendung mehrerer serieller Registeranordnungen überwindet die durch den A/D-Wandler auferlegten zeitlichen Beschränkungen. Der Geschwindigkeitsanstieg mit einer solchen Einrichtung ist proportional der Zahl der verfügbaren Ausgangskanäle. Ein durch eine bei 1 MHz arbeitende CCD-Kamera mit 4 Ausgangsregistern erfaßtes 14 Bit 100 x 100-Pixelbild kann 400 Bilder pro Sekunde erfassen. Die maximale Geschwindigkeitsbeschränkung, die

nicht überwunden werden kann, wird diktiert durch die Pixelauslesezeiten, die von 20 μ s bis 500 ns variieren. Für ein 100 \times 100-Pixelbild kann selbst die niedrigste Pixelauslesezeit 500 Bilder/s ermöglichen. Die Auslesezeiten bilden daher selten eine Limitierung für die Bildrate, vielmehr ist es eher der A/D-Wandler, der limitierend ist. Als Beweis hierfür sind Erfassungsraten von 2000/s mit einer 128 \times 128-Anordnung möglich gewesen (Ichikawa et al., 1992).

[0223] Eine CCD-Kamera, die besonders geeignet für die erfindungsgemäßen Verfahren ist, ist eine Kamera, die große Pixel bei geringem Rauschen und kurzer Abtastzeit erfaßt. Größere Pixelgrößen weisen größere Ladungskapazitäten auf und ermöglichen eine stärkere Ansammlung von Photonen und besitzen daher ein größeres maximales Signal-Rausch-Verhältnis (SRV). Die Basis für die Unterscheidung von Intensitätsänderungen beruht auf einem großen SRV, wie demnächst beschrieben wird. Entsprechend unterstützt ein geringes Rauschen die Verbesserung des SRV. CCDs vom MMP-Typ mit kleinerer Ladungskapazität und niedrigerem Dynamikbereich sind nicht gut geeignet. Die zeitliche Auflösung bei der kurzen Abtastzeit ist hoch und ermöglicht einen starken Datenstrom, der in Echtzeit im Computer-RAM oder auf der Festplatte speicherbar sein sollte. Die Quantenausbeute sollte angemessen sein. Die Linearität des CCDs ist nicht kritisch, sollte jedoch für wissenschaftliche Anwendungen ausgelegt sein (0,1%). Der Dynamikbereich ist nicht kritisch, weil die Donor-Fluorophore, die Bilder sind, ungefähr dieselbe Intensität aufweisen.

[0224] Eine Intensivierte-CCD (ICCD)-Kamera besteht zusätzlich zur CCD-Kamera aus einer Photokathode, einer Mikrokanalplatte (MCP) und einem Phosphorschirm. Fluoreszenzlicht trifft auf die Photokathode, wobei Photoelektronen in die MCP freigesetzt werden. Die MCP ist ein sekundärer Elektronenvervielfacher, der aus einer Anordnung von Millionen Glaskapillaren (Kanälen) besteht, die in Form einer dünnen Scheibe verschmolzen sind. Wenn Photoelektronen auf die Kanäle auftreffen, werden sekundäre Elektronen erzeugt. Die Passage der Elektronen durch die Kanäle produziert eine Verstärkung, die direkt als Verstärkung des Instruments kontrolliert wird. Jeder Kanal der MCP entspricht einem Bildelement. Die Ausgabe der MCP wird auf einen Phosphorschirm fokussiert, wo Elektronen, die die MCP verlassen, auftreffen. Das optische Bild wird auf dem Phosphorschirm reproduziert und durch eine CCD-Kamera erfaßt.

[0225] In einigen Fällen ist es bevorzugt, ein ICCD zu verwenden. Der Zusatz des Bildverstärkers bietet Hochgeschwindigkeits-"Gating" und hohe Verstärkung. Das "Gating" ist möglicherweise der wichtigste Aspekt des ICCDs. Es ist die elektronische Verschlussaktivität, die durch Kontrolle der Eingangsspannung für den Bildverstärker hervorgerufen wird. Gegenwärtig sind zeitaufgelöste Bildgebungsverfahren mit "Gating"-Zeiten im Nanosekunden- und Subnanosekundenbereich möglich (Thomas et al., 1992). Das "Gating" erlaubt aufgrund der zeitlichen Unterscheidung von Hintergrundsignalen eine bessere Signaldetektion. Beispiele für die zeitliche Unterscheidung und Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses sind die zeitgesteuerte ("time-gated") Fluoreszenzmikroskopie und das Pulsverfahren der Fluoreszenz-Lebensdauer-Bildgebungsspektroskopie. Die elektronische Verstärkung kann 10.000 : 1 betragen.

[0226] Dies ermöglicht es, schwache optische Signale über das Ausleserauschen hinaus zu verstärken.

[0227] Einzelne Photonenergebnisse können mit einem ICCD detektiert werden. Einzel-Fluorophor-Bildgebung ist zum Beispiel durch Sase et al., 1995, unter Verwendung einer CCD-Kamera, eines Bildverstärkers und einem Epifluoreszenzmikroskops erreicht worden. In "Real Time Imaging of Single Fluorophores on Moving Actin with an Epifluorescence Microscope," zeigen Sase et al., daß einzelne Fluorophore mit hoher Detektionseffizienz in Echtzeit dargestellt werden können. Andere Verfahren, die eine Empfindlichkeit zur Auflösung einzelner Moleküle erreicht haben, schließen Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (Eigen und Rigler, 1994; Kinjo und Rigler, 1995), Konfokale Fernfeldmikroskopie (Nie et al., 1994), kryogene Fluoreszenzspektroskopie (Kantha et al., 1995), Einzelmolekül-Photonenschauer-Zählung (Haab und Mathies, 1995; Castro und Shera, 1995; Goodwin et al., 1995; Peck et al., 1989; Nguyen und Keller 1987; Lee et al., 1994; Chen und Dovichi, 1996; Shera et al., 1990; Soper et al. 1992), Zweiphotonenanregungsfluoreszenz (two-photon excited fluorescence) (Mertz, 1995), und elektrochemische Detektion (Fan und Bard, 1995) ein.

[0228] Ein numerischer SRV-Wert kann auf Grundlage der gewünschten Aspekte einer CCD-Kamera ermittelt werden. Zum Beispiel ist eine CCD-Kamera, die die oben ausgeführten Kriterien erfüllt, eine EEV 05-20 CCD (Princeton Instruments, Princeton, NJ), die die in Tabelle 1 aufgeführten Spezifikationen aufweist:

CCD-Format	1152 x 770	Dynamikbereich, Bit	14 bis 17
Pixelgröße, μm	22,5 x 22,5	Nichtlinearität, %	<1 (16 Bit)
Sättigungsladung, ke°	500	Dunkelladung bei -120°C , Elektronen/Pixel-Stunde	<1
Ausleserauschen, e°	4-6, 50 kHz 22.500 kHz	Quanteneff., % Peak	40

[0229] Um ein SRV zu errechnen, wird eine Gleichung benötigt, die die verschiedenen Rauschwerte berücksichtigt. Bei jedem Detektionssystem existiert immer ein Basisniveau des Rauschens, das die Detektion von Signalen behindert, die schwach und vorübergehend sind. Je größer das gewünschte Signal, desto weniger wichtig wird das Basisniveau des Rauschens. Ein größeres Signal und somit ein größeres SRV kann erreicht werden durch Erhöhen entweder der Zahl der Fluorophore oder der Anregungsintensität. Die Gleichung zur Berechnung des SRV ist

$$\text{SRV} = \frac{\text{PE}}{\sqrt{N_{\text{Schrot}}^2 + N_{\text{Dunkel}}^2 + N_{\text{Auslesen}}^2 + N_{\text{Lampe}}^2}}$$

$$\text{PE} = \frac{I \xi \rho t \text{ENG}}{h\nu}$$

[0230] PE repräsentiert die Zahl der Photoelektronen, die von dem Detektor emittiert werden und steht in Beziehung zur Effizienz (E) des Detektorsystems. Je höher die Effizienz (E), desto größer die Zahl der Photoelektronen, die bei einer gegebenen Zahl von Photonen emittiert werden. PE steht ebenfalls in Beziehung zur Zahl der Fluorophore (N), der Vorverstärker-Verstärkung (G), Integrationszeit (t), Lichtintensität (I), dem molaren Extinktionskoeffizienten des Fluorophors (ϵ) und einer Fluoreszenzkonstante, die für das gewählte Fluorophor spezifisch ist (ρ). N_{Schrot} repräsentiert das Rauschen aufgrund der zufälligen Fluktuationen der Fluorophor-Emission und steht in Beziehung zur Größe des erzeugten Signals. Je größer das Signal, desto größer das Schrotrauschen. N_{Dunkel} und N_{Auslesen} sind Dunkelrauschen und Ausleserauschen. N_{Lampe} ist das Rauschen, das durch die Beleuchtungsquelle erzeugt wird. Es ist wichtig, zu beachten, daß N_{Lampe} große Einflüsse auf das SRV haben kann. Eine Beleuchtungsquelle, die eine Intensitätsschwankung von 1% aufweist, kann ein SRV in einer Größe von nur 100 : 1 aufweisen. In diesem Fall wird das Lampenrauschen durch Verwendung einer stabilen Spannungsversorgung minimiert. Zum Beispiel weisen kommerziell erhältliche (Uniphase) Helium-Neon-Laser mit modifizierten Spannungsversorgungen Intensitätsschwankungen von weniger als 0,002% der Gesamtintensität auf. Darüber hinaus kann eine Wolfram-Filament-Lampe mit einer stabilen Spannungsversorgung ausgestattet werden, so daß die Abgabe der Birne um weniger als 0,001% schwankt. Tabelle 2 listet die Werte für die Variablen auf und liefert den Grund, warum bestimmte Werte gewählt wurden.

Tabelle 2

Variable	Wert	Grund
I	30 W/cm ²	Intensität des 2-W-Lasers ist gegeben durch P/A. A ist der Strahlbereich. Intensität des Lasers ist 64 W/cm ²
ϵ	91.000 l/M cm	Molarer Extinktionskoeffizient für Fluoreszein
ρ	3,8 10 ⁻²¹ M cm ³	Konstante für die Fluoreszenzmission von Fluoreszein
t	0,010 s	Integrationszeit für den CCD-Betrieb bei 100 Bilder/s
E	0,025	Sammeleffizienz des Systems einschließlich Filtern, Objektiven und Quantenausbeute des CCDs
N	1000	Angemessene Zahl von Donor-Fluorophoren/Pixel
G	60	Typische Vorverstärker-Verstärkung; die Verstärkung

		für ein ICCD kann 10.000:1 betragen
h	6,6261 x 10 ⁻³⁴ Js	Plancksche-Konstante
ν	6,1224 x 10 ¹⁴ x s ⁻¹	c= $\nu\lambda$; $\lambda=490$ nm (Anregung des Fluoreszeins)
N _{Schrot}	632 e ⁻¹	N _{Schrot} = PE
N _{Lampe}	8 e ⁻¹	0,002% Intensitätsschwankung
N _{Auslesen}	40 e ⁻¹	Schätzung für hohe Auslesegeschwindigkeiten des EEV 05-20 CCDat
N _{Dunkel}	~0	Wert für EEV 05-20 CCD bei -120°C
SRV	631:1	Aus der obigen Gleichung

[0231] Ein SRV von 631 : 1 ist hoch. Ein hohes SRV stellt eine effiziente Detektion sowohl der Intensität als auch der Intensitätsänderungen sicher, oder, in anderen Worten, der Donor-Emission in An- und Abwesenheit eines Akzeptors. Zum Beispiel bedeutet ein SRV von 631 : 1, daß ein 66%iges Vertrauen besteht, eine 1,158%ige (1/632 x 100) Änderung in der Änderung des Signals zu detektieren. Es besteht ein 95%iges Vertrauen, eine 0,316%ige Änderung und ein 99,9%iges Vertrauen, eine 0,475%ige Änderung festzustellen. Je größer die Intensitätsänderung, desto größer die Chance der Detektion. Ein höheres Basislinien-SRV in Abwesenheit jeglicher Intensitätsänderungen ermöglicht größere Vertrauensintervalle für eine gegebene prozentuale Intensitätsänderung. Um das Vertrauen für die Detektion einer Signaländerung zu maximieren, ist es wichtig, große prozentuale Änderungen in Anwesenheit des Akzeptors zu erzeugen.

[0232] Ein Verfahren zur Erzeugung einer großen prozentualen Änderung besteht darin, mehrere Donor-Fluorophore um die Wechselwirkungsstation zusammenzufassen, z. B. in einem konzentrischen Ring, durch den das Polymer passieren kann, wobei sichergestellt wird, daß alle Donor-Fluorophore einen Energietransfer mit dem Akzeptor durchmachen. Eine ungefähre Weite eines solchen konzentrischen Rings von Donor-Fluorophoren kann durch die Emissionsrate des Donors und auch die Förster-Distanz des Donor-Akzeptor-Paars bestimmt werden. Typische Änderungen in der Intensität bei Akzeptor-Passage liegen im Bereich von 30% bis 50%, was eineinig einem Vertrauen von 100% entspricht.

[0233] Bevor die CCD-Kamera ein Signal verarbeiten kann, muß jedes erzeugte Signal durch Pixel des De-

tektorsystems erfaßt werden. Jedes Pixel sollte in der Lage sein, ein Signal von einer einzelnen Wechselwirkungsstation zu erfassen und sollte die Fähigkeit haben, vorübergehende Änderungen des Signals zu detektieren. Die durch ein Pixel detektierte Fläche einer Wechselwirkungsstation, z. B. der lokalisierte Bereich eines Mittels auf einem Nanokanal, wird bestimmt durch die Pixelgröße auf dem Detektor, die Vergrößerung des Bildes und auch die Beugungsgrenze der zu messenden Wellenlänge. Die Beziehung zwischen der gemessenen Fläche, der Pixelgröße des Detektors und der Vergrößerung ist durch die folgende Gleichung gegeben.

$$a = 2d/M$$

[0234] Die Größe der zu messenden Fläche ist gegeben durch a^2 , wobei a die Kantenlänge ist. Die Kantenlänge des Detektorpixels ist gegeben durch d . Die Vergrößerung ist gegeben durch M . Durch Einsetzen üblicher Werte für diese Variablen mit $d = 15 \mu\text{m}$ und $M = 60\times$ ergibt sich die Kantenlänge einer gemessenen Fläche zu 500 nm , was gut innerhalb des Auflösungsvermögens eines Signals mit 500 nm Wellenlänge liegt. Die Auflösungsgenauigkeit für eine mikroskopische Probe unter Epiillumination ist in der folgenden Gleichung (Matsumoto, 1993) wiedergegeben.

$$R_f = 0,61\lambda/NA$$

[0235] R_f ist die minimale Distanz zwischen zwei hellen Punkten, die aufgelöst werden können. λ ist die Wellenlänge der Donor-Fluoreszenz-Emission. NA ist die numerische Apertur des Mikroskopobjektivs. Aufgrund der inversen Beziehung zwischen NA und der Auflösungsgenauigkeit ist die höchste numerische Apertur erwünscht. NA ist gegeben durch das folgende klassische Kriterium für die Linsenauswahl (Taylor and Salmon, 1989):

$$NA = n \sin\Theta$$

[0236] n ist der Brechungsindex des Immersionsmediums. Es ist oftmals wünschenswert, ein Medium mit einem höheren Index einzusetzen, wie beispielsweise Öl. Θ ist der Winkel zwischen der optischen Achse und dem am weitesten randständigen Strahl, der in die Linse eintritt. Die numerische Apertur kann für Qualitätsmikroskopobjektive bei starken Vergrößerungen $1,4$ betragen. Aus der obigen Gleichung ergibt sich für ein Emissionssignal von 500 nm und eine Linse mit $NA 1,4$ eine Auflösungsgenauigkeit von 218 nm .

[0237] Die Schlußfolgerung aus der obigen Berechnung ist, daß zwei benachbarte Pixel auf der Detektionseinheit jeweils Signale von ihren entsprechenden Wechselwirkungsstationen ohne Konfusion hinsichtlich des Ursprungs der Signale detektieren können. Durch sorgfältige Berechnung der Vergrößerung und der Pixelgröße kann eine gegenseitige Störung zwischen Pixeln vermieden werden. Zum Beispiel wird eine Kantenlänge von 120 nm auf der detektierten Fläche erreicht, wenn die kleinste Pixelgröße ($d = 6 \mu\text{m}$) und die größte Vergrößerung ($M = 100\times$) verwendet werden. Da die Auflösungsgenauigkeit des Systems konstant bei 218 nm bleibt, würde eine gegenseitige Beeinträchtigung von Signalen vorliegen. Dies kann vermieden werden, indem vor der Festlegung des experimentellen Aufbaus Berechnungen durchgeführt werden. Durch Anpassung der Vergrößerung und der Pixelgröße auf dem Detektionssystem kann daher eine optimale Zahl erreicht werden, bei der die gemessene Fläche der Beugungsgrenze entspricht. Diese kann aus einer Kombination der obigen zwei Formeln bestimmt werden, indem die Kantenlänge gleich der oder größer als die Auflösungsgenauigkeit des Detektionssystems gesetzt wird:

$$2d/M \geq 0,61\lambda/NA$$

[0238] Die Dichte der Wechselwirkungsstationen kann verändert werden, so daß nur eine Wechselwirkungsstation einem Pixel auf dem Detektionssystem entspricht. Wenn zum Beispiel eine Platte mit 4×10^6 Nanokanälen/cm² verwendet wird, finden sich $0,01$ Nanokanäle (Wechselwirkungsstationen) pro Pixel bei Verwendung von $60\times$ Vergrößerung und einer Pixelgröße von $15 \mu\text{m}$. Die Wechselwirkungsstationsdichte kann auch nach unten angepaßt werden, z. B. liegt ein durchschnittlicher minimaler Abstand von $48 \mu\text{m}$ zwischen Poren innerhalb des geeigneten Bereichs.

[0239] Über die Intensitätsbildgebung hinaus können sowohl zeitgesteuerte Fluoreszenzmikroskopie als auch Fluoreszenzlebensdauer-Bildgebung zur Detektion von Signalen nach den erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden. Zeitgesteuerte Fluoreszenzmikroskopie und Fluoreszenzlebensdauer-Bildgebung sind eingreifendere Verfahren, die Vorteile aufweisen wie beispielsweise die zeitliche Unterscheidung von Fluoreszenzsignalen und bessere Signal-Rausch-Verhältnisse im Vergleich zur Intensitäts-Bildgebung.

[0240] Zeitsteuerung ("time-gating") ist vorteilhaft, wenn eine nennenswerte Hintergrundstreuung oder Autofluoreszenz vorhanden ist. Hintergrundlichtstreuung ist ein Problem, wenn die gestreuten Wellenlängen zu den Emissions-Wellenlängen des gewünschten Fluorophors gleich sind. Streueffekte können durch Verwendung eines Fluorophors mit einer starken Stokes-Verschiebung vermieden werden, so daß die gestreuten Wellenlängen kürzer sind als die detektierte Wellenlänge. In diesem Fall kann das gestreute Licht durch Verwendung eines optischen Filters eliminiert werden. Auf der anderen Seite ist Autofluoreszenz ein verbreitetes Problem, das im wesentlichen alle Studien beeinflusst, die Fluoreszenzmikroskopie einsetzen. Autofluoreszenz kann aus Lösungsmitteln, Soluten und den optischen Komponenten des Mikroskopsystems hervorgehen. Die Autofluoreszenz setzt das Signal-Rausch-Verhältnis für die Detektion herab. Dies ist der Fall, obwohl es viele Verbesserungen bei den verschiedenen Bestandteilen des Detektorsystems gegeben hat (Periasamy und Herman, 1994).

[0241] Zeitgesteuerte Fluoreszenzmikroskopie (TGFM) verwendet unterschiedliche Fluoreszenzlebensdauern, um eine Unterscheidung zwischen Autofluoreszenz und Fluoreszenz vorzunehmen. Die Lebensdauer von fluoreszierenden Farbstoffen kann so gewählt werden, daß sie länger ist als die der Autofluoreszenz. Kurzlebige Autofluoreszenz geht in weniger als 1 μ s auf Null herunter, wohingegen langlebige Fluoreszenz Lebensdauern von 1 μ s bis 10 ms zeigen kann (bspw. Europium-Chelate, Lanthanid-Chelate). Die Anregung der Probe wird mit einem kurzen Intensitätspuls vorgenommen, der kürzer ist als die Lebensdauer der Autofluoreszenz oder der Fluoreszenz. Es folgt ein exponentielles Abklingen. Wenn Messungen nur nach dem Abklingen des Fluoreszenzsignals vorgenommen werden, werden die längerlebigen Signale mit einer größeren Empfindlichkeit gemessen.

[0242] Ein Beispiel für eine Bildgebungsvorrichtung für TGFM wird in Periasamy, 1995, bereitgestellt. In der Literaturstelle ist ein Fluoreszenzmikroskop (Nikon) mit Epiillumination-Fähigkeiten und einem Dauerstrichlaser (Coherent oder Spectra-Physics) dargestellt, der bei der gewünschten Anregungswellenlänge emittiert. Das anregende Laserlicht wird durch einen "Chopper" mit einer "Chopper"-Steuerung aufgeteilt, um Laserimpulse mit definierten Pulsweiten zu erzeugen. Die Intensität des Lichts wird durch Verwendung eines variablen neutralen Dichtefilters (Omega Optics) kontrolliert. Um die Meßzeit zu verzögern wird ein Verzögerungs-Puls-Generator verwendet, um ein Signal zur Kontrolle eines gesteuerten Hochfrequenz-Bildverstärkers (Hamamatsu) oder eines Choppers im Emissionslichtpfad zu erzeugen. Eine CCD-Kamera (Princeton Instruments oder Photometrics) wird zur Erfassung der Signale verwendet.

[0243] Die Fluoreszenzlebensdauer repräsentiert die durchschnittliche Zeitspanne, die ein Molekül im angeregten Zustand bleibt, bevor es in den Grundzustand zurückfällt. Es gibt zwei Verfahren zur Messung von Fluoreszenzlebensdauern. Dies sind das Pulsverfahren und das Phasenmodulationsverfahren (Lakowicz, 1986; McGown, 1989; Gratton und Limkema, 1983). Bei dem Pulsverfahren wird die Probe mit einem kurzen Lichtpuls angeregt und die zeitabhängige Fluoreszenzabnahme wird gemessen. Beim Phasenmodulationsverfahren wird die Probe mit einem sinusoidal modulierten Licht angeregt. Die Phasenverschiebung und Demodulation wird zur Ermittlung der Lebensdauer verwendet. Bis vor kurzem wurden Lebensdauerermessungen nur mit Küvettenproben eingesetzt. In den vergangenen fünf Jahren sind Verfahren entwickelt worden, die mikroskopische zweidimensionale Auflösung und hochauflösende Lebensdauerermessungen kombinieren (Rodgers und Firey, 1985; Wang et al., 1990; Morgan et al., 1990; Clegg et al., 1991; Lakowicz und Berndt, 1991; Buurman et al., 1992; van de Ven und Gratton, 1992; Oida et al., 1993). Die Entwicklung der Fluoreszenzlebensdauerbildgebungsmikroskopie (fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) ermöglicht die genaue Untersuchung der Lage und Umgebung von Fluoreszenzmarkern in Zellen und anderen mikroskopischen Proben. Im folgenden werden die Vorteile, Theorie und Anwendungen der FLIM diskutiert.

[0244] Fluoreszenzlebensdauerermessungen sind aus verschiedenen Gründen verwendet worden, einschließlich Spezifität, Empfindlichkeit, Quantifizierung und hoher zeitlicher Auflösung (Wang et al., 1996). Die Messung von Lebensdauern bietet eine hohe Spezifität, weil fluoreszierende Moleküle unterschiedliche Lebensdauern aufweisen. Im Vergleich zu Absorption und Emissionen bieten Lebensdauern eine bessere Unterscheidung von Molekülen. Lebensdauern können auch bei kleinen Molekülmengen durchgeführt werden, was zu gleichen Empfindlichkeiten führt wie Intensitätsmessungen. Die Quantifizierung von Molekülen durch Lebensdauern bietet eine wahre Messung, weil die Fluoreszenzlebensdauer direkt in Beziehung zur Fluoreszenzquantenausbeute des Fluorophors steht. Schließlich können Lebensdauern verwendet werden, um zeitliche Ereignisse zu detektieren, die auf der Zeitskala biomolekularer Vorgänge, im allgemeinen zwischen einer Picosekunde und einer Mikrosekunde, stattfinden.

[0245] Es gibt zwei Verfahren zur Bestimmung von Lebensdauern. Das Pulsverfahren wird zuerst beschrieben (Lakowicz, 1986). Man betrachte einen kurzen Puls von Licht, der eine Population von Fluorophoren an-

regt. Das Fluoreszenzsignal des angeregten Moleküls klingt über die Zeit nach einer Funktion erster Ordnung ab, gegeben durch die folgende Exponentialfunktion:

$$I(t) = Ae^{(-t/\tau)}$$

a ist eine künstliche Konstante, t ist die Zeit und τ ist die Fluoreszenzlebensdauer. Die Fluoreszenzlebensdauer ist die Zeit, die erforderlich ist, damit die Intensität auf $1/e$ des ursprünglichen Wertes abklingt, eine Abnahme von 63%. Eines der Verfahren, um die Lebensdauer experimentell zu messen, besteht in der Verwendung eines Pulserfassungsverfahrens (Herman et al., 1996). D_1 und D_2 werden auf aufeinanderfolgenden Bildern erfaßt. Die Bilder werden mit einer Lebensdauergleichung analysiert und ein Fig. 2- und 2-D-Lebensdauer-Array wird erzeugt. Im Anschluß an jedes Anregungsereignis wird der an der CCD-Kamera angebrachte multikanalplattengesteuerte Bildverstärker (multichannel plate gated image intensifier, MCP-GII) für ein sehr kurzes Intervall (d. h. 4 ns) bei einem Zeitintervall (t_1) nach dem Anregungsimpuls angeschaltet. Die Emission wird auf einem CCD erfaßt, das durchgehend eingeschaltet ist. Der identische Vorgang wird sehr oft wiederholt, um ein ausreichendes Signal auf einem Bild des CCD zu erfassen. Nachdem ein ausreichendes Signal t_1 erzeugt wurde, wird der CCD ausgelesen und das Steuerfenster in bezug auf den Anregungspuls (t_2) wird verschoben und der ganze Vorgang wird wiederholt. Die Interpretation von zwei Bildern mit einer Pixel-für-Pixel-Analyse ergibt die Lebensdauer des Bildes an jedem Punkt.

[0246] Wang et al., 1996, beschreiben, daß die Vorrichtung für Impuls-FLIM aus fünf Hauptkomponenten besteht: 1) gepulste Lichtquelle; 2) Bilddetektionssystem (gesteuerte Bildverstärker und CCD-Kamera 3) Zeitkontrollereinheit; 4) und Fluoreszenzmikroskop. Das System ist identisch mit der Vorrichtung, die oben für zeitgesteuerte Fluoreszenzmikroskopie (time-gated fluorescence microscopy, TGFM) beschrieben wurde, mit Ausnahme der gepulsten Lichtquelle, die eine im Pikosekundenbereich gepulste Lichtquelle (Coherent) ist, die aus einem modusblockierten ("mode-locked") YAG-Laser, einem Farbstofflaser mit einem dritten Frequenzteiler, und einem "Cavity dumper" besteht. Die Pulse im Pikosekundenbereich besitzen einstellbare Wellenlängen von UV bis IR. Raten von Einzelschuß bis zu 76 MHz werden erzeugt.

[0247] Das zweite Verfahren zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer ist das Phasenmodulationsverfahren. Anstatt eine gepulste Lichtquelle zur Anregung zu verwenden, verwendet das Verfahren ein Licht, dessen Intensität sinusoidal moduliert ist. Die Emission der Probe folgt daher denselben sinusoidalen Veränderungen. Die modulierte Emission ist aufgrund der Anregungslebensdauer der fluoreszierenden Moleküle in der Phase verzögert. Darüber hinaus gibt es eine Demodulation der Emission. In anderen Worten, die Amplitude der endgültigen Emission weist eine kleinere Amplitude auf als die des anregenden Lichts. Sowohl der Phasenwinkel (ϕ) als auch der Demodulationsfaktor ($m = BA/ba$) werden gemessen und zur Ermittlung der Phasen- (τ_p) und Modulationslebensdauern (τ_m) (Lakowicz, 1986).

$$\tau_p = \frac{\tan \phi}{\omega} \quad \tau_m = \frac{\sqrt{(1/m^2) - 1}}{\omega}$$

[0248] Bei einfachem exponentiellen Abklingen, $\tau_p = \tau_m = \tau$, der tatsächlichen Lebensdauer.

[0249] Die grundlegende Theorie hinter der Phasenmodulationslebensdauerbestimmung kann auf ein zweidimensionales Bildgebungssystem angewendet werden. Die folgende Beschreibung basiert auf Gadella et al., 1993 und Lakowicz und Szmackinski, 1996, die jeweils durch Inbezugnahme hier aufgenommen sind. Das Verfahren verwendet einen verstärkermodulierten Bildverstärker, der ein Bild erzeugt, das eine Intensität aufweist, die in Beziehung steht zur Phasenverschiebung des Emissionssignals. Bei Verwendung von mehreren phasensensitiven Bildern, die mit verschiedenen elektronischen Verzögerungen oder Phasenverschiebungen aufgezeichnet wurden, ist es möglich, das Lebensdauerbild des Objekts zu ermitteln. Um dies genauer zu verstehen, ist es erforderlich, die Gleichung darzustellen, die die zeitlich gemittelte phasensensitive Intensität von einer bestimmten Position r beschreibt:

$$I(r, \theta - D) = I_0(r)[1 + \frac{1}{2}m_D m(r) \cos(\theta(r) - \theta_D)]$$

[0250] Wobei r die Pixelposition angibt, θ_D der Phasenwinkel der Emission ist, m_D die Verstärkungs-Modulation des Detektors ist, $m(r)$ die modulierte Amplitude der Emission ist, $I_0(r)$ die ursprüngliche Intensität des Pixels ist (die von der Konzentration abhängt). Die Gleichung beschreibt die Intensität eines gegebenen Pixels als Funktion von zwei kontrollierten Parametern (θ_D und m_D) und drei Unbekannten ($I_0(r)$, $\theta(r)$, $m(r)$). Man erinnere sich, daß die Lebensdauer (τ) bestimmt werden kann, wenn entweder $\theta(r)$ oder $m(r)$ bekannt ist. Da drei Unbekannte vorhanden sind, werden mindestens drei verschiedene Bilder benötigt, um die Lebensdauer der Pro-

be zu bestimmen. Durch Kontrolle des Phasenwinkels des Verstärkungs-Modulationssignals (θ_D) wird eine Reihe von phasensensitiven Bildern erzeugt und die Lebensdauer kann somit bestimmt werden.

[0251] Die Vorrichtung zur Phasenmodulations-FLIM wird in Lakowicz und Szmazinski, 1996, beschrieben. Die Anregung wird bereitgestellt durch die Abgabe eines gütegeschalteten Lasers, der synchron durch einen modusblockierten Nd:YAG-Laser gepumpt wird. Das Anregungslicht wird durch einen Laserstrahlaufweiter aufgeweitet. Der gesteuerte Bildverstärker ist zwischen dem Ziel und der CCD-Kamera angeordnet. Die Verstärkung des Bildverstärkers wird durch die Ausgabe eines Frequenzgenerators moduliert. Eine CCD-Kamera erfaßt die phasensensitiven Bilder. Ein Computer mit FLIM-Software verarbeitet die Ausgabe, um ein Lebensdauerbild zu erzeugen.

[0252] Andere bei dem Verfahren beteiligte Wechselwirkungen erzeugen ein Kernstrahlungssignal. Wenn eine Radiomarkierung auf einem Polymer den definierten Detektionsbereich, beispielsweise die Station, passiert, wird Kernstrahlung emittiert, von der etwas den definierten Strahlungsdetektionsbereich passieren wird. Ein Detektor für Kernstrahlung ist in der Nähe zu dem definierten Strahlungsdetektionsbereich angeordnet, um emittierte Strahlungssignale zu erfassen. Viele Verfahren zur Messung von Kernstrahlung sind im Stand der Technik bekannt, einschließlich Nebel- und Blasenkammervorrichtungen, Gleichstrom-Ionenkammern, Impulzzählern, Gaszählern (d. h. Geiger-Müller-Zählern), Festphasendetektoren (Oberflächenbarrieredetektoren, lithiumgedrifteten Detektoren, intrinsischen Germanium-Detektoren), Szintillationszählern, Cerenkov-Detektoren etc.

[0253] Andere erzeugte Signalarten sind im Stand der Technik gut bekannt und haben viele Detektionsmittel, die dem Fachmann gut bekannt sind. Unter diesen befinden sich einander gegenüberliegende Elektroden, Magnetresonanz- und piezoelektrische Rasterspitzen. Gegenüberliegende Nanoelektroden können durch Messung von Kapazitätsänderungen gemessen werden. Zwei gegenüberliegende Elektroden erzeugen einen Energiespeicherbereich, der effektiv zwischen den beiden Elektroden liegt. Es ist bekannt, daß die Kapazität von zwei gegenüberliegenden Elektroden sich ändert, wenn verschiedene Materialien zwischen den Elektroden plaziert werden. Dieser Wert ist als Dielektrizitätskonstante bekannt. Änderungen in der Dielektrizitätskonstante können als Änderung in der Spannung zwischen den beiden Elektroden gemessen werden. Beim vorliegenden Beispiel erzeugen verschiedene Nukleotidbasen oder Einheiten eines Polymers verschiedene Dielektrizitätskonstanten. Die Kapazität ändert sich als Dielektrizitätskonstante der Einheit des Polymers nach der Gleichung: $C = KC_0$, wobei K die Dielektrizitätskonstante ist und C_0 die Kapazität in Abwesenheit jeglicher Base ist. Der Spannungsaussschlag der Nanoelektroden wird dann an eine Meßvorrichtung ausgegeben, die Änderungen des Signals über die Zeit aufzeichnet.

[0254] Eine NMR-Detektionsvorrichtung im Nanometerbereich kann konstruiert werden, um die Passage von spezifischen Spin-markierten Polymereinheiten zu detektieren. Eine NMR-Detektionsvorrichtung im Nanometerbereich besteht aus Magneten, die gewobbelt werden können, und Mitteln zur Bestrahlung des Polymers mit elektromagnetischer Energie einer konstanten Frequenz (dies ist identisch zur Konstanthaltung des magnetischen Feldes, während die elektromagnetische Frequenz gewobbelt wird). Wenn das magnetische Feld die richtige Stärke erreicht, absorbieren die Kerne Energie und Resonanz tritt auf. Diese Absorption führt dazu, daß ein winziger elektrischer Strom in einer die Probe umgebenden Antennenspule fließt. Das Signal wird verstärkt und an eine Aufzeichnungsvorrichtung ausgegeben. Für bekannte markierte Verbindungen ist die Detektionszeit viel schneller als gegenwärtige Mittel zur NMR-Detektion, bei denen ein volles Spektrum der fraglichen Verbindung erforderlich ist. Bekannte markierte Einheiten von Polymeren weisen bekannte chemische Verschiebungen in bestimmten Bereichen auf, wodurch das Erfordernis von vollständigen Spektrenwobbelungen sich erübrigt, was die Detektionszeit pro Base auf Mikro- oder Millisekunden reduziert.

[0255] Eine piezoelektrische Rasterspitze im Nanometerbereich kann auf Basis eines physikalischen Kontakts der verschiedenen Polymereinheiten mit der Spitze zur Auslesung verschiedener Einheiten des Polymers verwendet werden. In Abhängigkeit von der Größe und Form der Polymereinheit werden verschiedene piezoelektrische Signale hervorgerufen, die eine Reihe von einheitsabhängigen Änderungen erzeugen. Markierungen auf Einheiten unterscheiden sich physikalisch von nativen Einheiten und können ein leichtes Mittel zur Detektion via eine piezoelektrische Rasterspitze bilden. Beim Kontakt einer Polymereinheit mit der Spitze ändern sich die piezoelektrischen Kristalle und erzeugen einen Strom, die an eine Detektionsvorrichtung ausgegeben wird. Die Amplitude und Dauer des durch die Wechselwirkung zwischen der Polymereinheit und der Spitze erzeugten Stroms sind charakteristisch für die Polymereinheit.

[0256] Optisch detektierbare Signale werden erzeugt, detektiert und in einer Datenbank gespeichert, die Signale können zur Bestimmung von Strukturinformationen über das Polymer analysiert werden. Der Computer

kann derselbe Computer sein, der zur Sammlung der Daten über das Polymer verwendet wurde, oder kann ein separater Computer sein, der der Datenanalyse gewidmet ist. Ein geeignetes Computersystem zur Implementierung der vorliegenden Erfindung beinhaltet typischerweise eine Ausgabeeinrichtung, die Informationen für einen Nutzer anzeigt, einer Haupteinheit, die an die Ausgabeeinrichtung angeschlossen ist, und eine Eingabeeinrichtung, die Eingaben vom Nutzer empfängt. Die Haupteinheit beinhaltet typischerweise einen Prozessor, der über einen Verbindungsmechanismus an ein Speichersystem angeschlossen ist. Die Eingabeeinrichtung und die Ausgabeeinrichtung sind ebenfalls über den Verbindungsmechanismus an den Prozessor und das Speichersystem angeschlossen.

[0257] Nanokanäle können durch stromlose Abscheidungsverfahren hergestellt werden, die eine Metallfibrille erzeugen, die sich über die volle Breite einer Vorlagenmembran aus Polycarbonat erstreckt. Die Membran kann auch so hergestellt werden, daß beide Seiten der Membran mit dünnen Metallschichten bedeckt sind, um eine Nanoscheibenelektrodenanordnung zu bilden, wobei einer der Metallfilme entfernt werden kann, um die Oberfläche der Membran freizulegen. Die Metallfilme können entfernt werden, um die Oberfläche der Membran freizulegen. Diese Elektroden können an ihren Basen mit einem üblichen Stromabnehmer verbunden werden. Dieser Aufbau ist geeignet zur Untersuchung von Stromänderungen, da beim Durchfluß von Polymeren Änderungen in der Leitfähigkeit gemessen werden können. Die Herstellung von solchen Platten ist in Martin, C. P. R., Science, 266: 1961–1965 (1994) beschrieben.

[0258] Computerprogramme für die Datenanalyse des detektierten Signale sind von CCD-Herstellern leicht erhältlich. Solche Programme können unter Verwendung eines Mehrzweck-Computers, wie beispielsweise unten beschreiben, ausgeführt werden. Die erfindungsgemäßen Verfahren müssen lediglich Operationen (Punktoperationen) an einzelnen Pixeln vorgenommen werden. Die Komplexität der Punktoperationen hängt vom verwendeten Bildgebungsverfahren ab. Intensitätsbasierte Bildgebung bietet die schnellste Manipulation von Daten, da nur Arithmetik auf die einzelnen Pixel angewendet wird. Unabhängig von der Bildgebungstechnik (Intensität, TGFM oder FLIM) werden die auf jedes Pixel in jedem Verfahren angewendeten Algorithmen auf niedriger Stufe angesiedelt, verglichen mit übergreifenden auf ganze Bilder gerichteten Operationen, die in bestimmten komplexeren Bildgebungssituationen angewendet werden müssen.

[0259] Es sollte verstanden werden, daß ein oder mehrere Ausgabeeinrichtungen an das Computersystem angeschlossen sein können. Beispielhafte Ausgabeeinrichtungen schließen Kathodenstrahlröhren(CRT)-Anzeigen, Flüssigkristall-Anzeigen (LCD), Drucker, Kommunikationsvorrichtungen wie beispielsweise ein Modem und eine Audioausgabe ein. Es sollte auch verstanden werden, daß ein oder mehrere Eingabeeinrichtungen an das Computersystem angeschlossen sein können. Beispielhafte Eingabeeinrichtungen schließen eine Tastatur, ein Tastenfeld, einen Trackball, eine Maus, Stift und Tablett, eine Kommunikationsvorrichtung und Dateneingabevorrichtungen wie beispielsweise Sensoren ein. Es sollte verstanden werden, daß die Erfindung nicht auf die bestimmten Eingabe- oder Ausgabeeinrichtungen, die zusammen mit dem Computersystem verwendet werden, oder auf die hier beschrieben beschränkt ist.

[0260] Das Computersystem kann ein Mehrzweck-Computersystem sein, das mittels einer höheren Programmiersprache wie beispielsweise AC@ programmierbar ist. Das Computersystem kann auch speziell programmierte Hardware für Spezialzwecke sein. Bei einem Mehrzweck-Computersystem ist der Prozessor üblicherweise ein kommerziell erhältlicher Prozessor, wofür die x86-Prozessorreihe, erhältlich von Intel, und ähnliche Vorrichtungen von AMD und Cyrix, die Mikroprozessoren der 680X0-Reihe, erhältlich von Motorola, der PowerPC-Mikroprozessor von IBM und die Prozessoren der Alpha-Reihe von Digital Equipment Corporation Beispiele sind. Viele andere Prozessoren sind erhältlich. Solche ein Mikroprozessor führt ein Programm aus, das als Betriebssystem bezeichnet wird, wofür WindowsNT, Unix, DOS, VMS und OS8 Beispiele sind, die die Ausführung von anderen Computerprogrammen kontrollieren und Planung, Fehlersuche, Eingabe/Ausgabe-Kontrolle, Bilanzierung, Kompilierung, Speicherzuordnung, Datenmanagement und Speichermanagement und Kommunikationskontrolle und verwandte Dienste bereitstellt. Der Prozessor und das Betriebssystem definieren eine Computer-Plattform, für die Anwendungsprogramme in höheren Programmiersprachen geschrieben werden.

[0261] Ein Speichersystem beinhaltet typischerweise ein computerlesbares und -beschreibbares nichtflüchtiges Aufzeichnungsmedium, wofür eine Magnetscheibe, ein Flash-Speicher und ein Band Beispiele sind. Die Scheibe kann entfernbar sein, bekannt als Diskette, oder permanent sein, bekannt als Festplatte. Eine Scheibe weist eine Zahl von Spuren auf, in denen Signale typischerweise in binärer Form, d. h. einer Form, die als eine Sequenz aus Einsen und Nullen interpretiert wird, gespeichert werden. Solche Signale können ein Anwendungsprogramm bilden, das durch den Mikroprozessor auszuführen ist, oder Information, die auf der Scheibe gespeichert ist, um von dem Anwendungsprogramm verarbeitet zu werden. Im Betrieb bewirkt der Prozessor

typischerweise, daß Daten aus dem nichtflüchtigen Speichermedium in ein Speicherelement aus integrierten Schaltkreisen gelesen werden, was typischerweise ein flüchtiger Zufallszugriffsspeicher wie beispielsweise ein dynamischer Zufallszugriffsspeicher (DRAM) oder statischer Speicher (SRAM) ist. Das Speicherelement aus integrierten Schaltkreisen erlaubt einen rascheren Zugriff auf die Information durch den Prozessor als die Scheibe. Der Prozessor manipuliert die Daten im allgemeinen in dem Speicher aus integrierten Schaltkreisen und kopiert die Daten auf die Scheibe, wenn die Verarbeitung abgeschlossen ist. Eine Vielzahl von Mechanismen sind bekannt zur Bewerkstelligung der Datenbewegung zwischen der Scheibe und dem Speicherelement aus integrierten Schaltkreisen und die Erfindung ist nicht hierauf beschränkt. Es sollte auch verstanden werden, daß die Erfindung nicht auf ein bestimmtes Speichersystem beschränkt ist.

[0262] Es sollte verstanden werden, daß die Erfindung nicht auf eine bestimmte Computerplattform, einen bestimmten Prozessor oder eine bestimmte höhere Programmiersprache beschränkt ist. Darüber hinaus kann das Computersystem ein Multiprozessor-Computersystem sein oder kann mehrere Computer beinhalten, die über ein Computernetzwerk verbunden sind.

[0263] Die über das Polymer gespeicherten Daten können in einer Datenbank oder in einer Datendatei in dem Speichersystem des Computers gespeichert werden. Die Daten für jedes Polymer können so in dem Speichersystem gespeichert sein, daß sie unabhängig von den Daten zu anderen Polymeren für den Prozessor verfügbar sind, zum Beispiel durch Zuordnen einer eindeutigen Kennzeichnung zu jedem Polymer.

[0264] Die in den Daten enthaltene Information und wie sie analysiert wird, hängt von der Zahl und der Art der markierten Einheiten ab, die mit dem Mittel zur Erzeugung eines Signals in Wechselwirkung gebracht wurden. Wenn beispielsweise jede Einheit eines einzelnen Polymers markiert ist, wobei jede Art von Einheit (z. B. alle As der Nukleinsäure) einen bestimmten Markertyp aufweist, dann ist es möglich, aus der Analyse eines einzelnen Polymers die Reihenfolge jeder Einheit in dem Polymer zu bestimmen. Wenn jedoch nur eine der vier Arten von Einheiten eines Polymers wie beispielsweise einer Nukleinsäure markiert ist, dann sind mehr Daten erforderlich, um die vollständige Sequenz der Nukleinsäure zu bestimmen. Mehrere Markierungsschemata und Analyseverfahren werden unten ausführlicher beschrieben. Die Markierungsstrategien in bezug auf Nukleinsäuren werden zur Erleichterung der Diskussion beschrieben. Jede dieser Strategien ist jedoch zur Markierung aller Polymere geeignet.

[0265] Mehrere verschiedene Strategien zur Markierung sind möglich, beinhaltend eine Unzahl von verschiedenen Arten von markierten Nukleotiden, verschiedenen Prozentanteilen von markierten Nukleotiden sowie Einzelstrang- oder Doppelstrang-Markierung und Diversifitätsmarker wie beispielsweise Verbindungen, die an ein Polymer mit einer bestimmten Sequenz binden (Diversifitätsmarker werden unten in bezug auf bestimmte Ausführungsformen ausführlicher beschrieben). Das einfachste Markierungsschema beinhaltet die Markierung von allen vier Nukleotiden mit verschiedenen Markern. Markierungsschemata mit drei, zwei oder nur einem Marker sind ebenfalls möglich.

[0266] Ein Vier-Nukleotid-Markierungsschema kann erzeugt werden, wobei die As, Cs, Gs und Ts einer Ziel-DNA mit verschiedenen Markern markiert ist. Solche ein Molekül erzeugt beim Passieren einer Wechselwirkungsstation eine lineare Reihe von Signalen, die der linearen Sequenz der Nukleotide in der Ziel-DNA entspricht. Der Vorteil bei der Verwendung einer Vier-Nukleotid-Strategie besteht in der Einfachheit der Dateninterpretation und der Tatsache, daß die vollständige Sequenz der Einheiten anhand eines einzelnen markierten Polymers bestimmt werden kann. Die Zugabe von extrinsischen Markern zu allen vier Basen kann jedoch Probleme durch sterische Behinderung verursachen. Um dieses Problem zu reduzieren, können die intrinsischen Eigenschaften einiger oder aller Nukleotide verwendet werden, um die Nukleotide zu markieren. Wie oben beschrieben, werden Nukleotide intrinsisch markiert, weil jedes der Purine und Pyrimidine unterschiedliche Absorptionsspektrumeigenschaften aufweist. Bei jedem der hier beschriebenen Markierungsschemata können die Nukleotide entweder extrinsisch oder intrinsisch markiert sein, es ist jedoch bevorzugt, daß mindestens einige der Nukleotide intrinsisch markiert sind, wenn das Vier-Nukleotid-Markierungsverfahren verwendet wird. Es ist auch bevorzugt, daß die Marker klein und neutral in der Ladung sind, um eine sterische Behinderung zu verringern, wenn extrinsische Marker bei dem Vier-Nukleotid-Markierungsschema eingesetzt werden.

[0267] Ein Drei-Nukleotid-Markierungsschema, bei dem drei der vier Nukleotide markiert sind, kann ebenfalls durchgeführt werden. Wenn nur drei der vier Nukleotide markiert sind, ist die Analyse der durch die erfindungsgemäßen Verfahren erzeugten Daten komplizierter, als wenn alle vier Nukleotide markiert sind. Die Daten sind komplizierter, weil die Anzahl und Position der Nukleotide der vierten unmarkierten Art getrennt bestimmt werden muß. Ein Verfahren zur Bestimmung der Zahl und Position des vierten Nukleotids setzt die Analyse von zwei verschiedenen Gruppen markierter Nukleinsäuremoleküle ein. Zum Beispiel kann ein Nukleinsäuremole-

kül mit A, C und G und ein anderes mit C, G und T markiert sein. Die Analyse der Reihenfolge der markierten Nukleotide aus den zwei Gruppen ergibt Sequenzdaten. Es gibt viele verschiedene Möglichkeiten, die drei Nukleotide für jede Gruppe zu wählen, solange die beiden Gruppen alle vier markierten Nukleotide enthalten.

[0268] Zum Beispiel kann die Gruppe ACG mit einer Gruppe aus markiertem CGT, ACT oder AGT gepaart werden.

[0269] Die Sequenz einschließlich des vierten Nukleotids kann auch durch Verwenden eines einzelnen markierten Polymers anstatt einer Gruppe von mindestens zwei verschieden markierten Polymeren durch Identifizierung des Anteils des vierten Nukleotids an dem Polymer bestimmt werden. Dies kann erreicht werden durch Bestimmung des Abstandes zwischen markierten Nukleotiden in einem Nukleinsäuremolekül. Zum Beispiel werden A, C und G markiert und die erzeugten detektierbaren Signale zeigten an, daß das Nukleinsäuremolekül eine Sequenz von AGGCAAACG aufwies. Wenn die Abstände zwischen jedem der Nukleotide in dem Nukleinsäuremolekül in dem Nukleinsäuremolekül der bekannten Internukleotiddistanz für eine bestimmte Kombination von Nukleotiden entsprechen, mit der Ausnahme, daß der Abstand zwischen G und G zweimal der normalen Internukleotiddistanz entspricht, dann ist ein T zwischen den beiden Gs angeordnet und das Gesamtmolekül besitzt eine Sequenz von AGTGCAAACG. Der Abstand zwischen Nukleotiden kann auf mehreren Wegen ermittelt werden. Erstens können das Polymer und das Mittel in bezug aufeinander in einer linearen Weise und in einer konstanten Geschwindigkeit bewegt werden, so daß eine einzelne Einheit des Nukleinsäuremoleküls das Mittel in einem einzelnen Zeitintervall passieren wird. Wenn zwei Zeitintervalle zwischen detektierbaren Signalen ablaufen, dann ist das unmarkierte Nukleotid, das nicht in der Lage ist, ein detektierbares Signal hervorzurufen, an dieser Position zugegen. Dieses Verfahren zur Bestimmung des Abstandes zwischen Basen wird unten ausführlicher unter Bezugnahme auf Zufalls-Einbasen-Markierung beschrieben. Alternativ können das Polymer und das Mittel dazu veranlaßt werden, miteinander in Wechselwirkung zu treten, so daß jede markierte Einheit gleichzeitig mit einem Mittel wechselwirkt, um gleichzeitig detektierbare Signale zu erzeugen. Jedes erzeugte detektierbare Signal tritt an der Stelle entlang des Polymers auf, wo die die Einheit angeordnet ist. Der Abstand zwischen den detektierbaren Signalen kann direkt ermittelt werden, um zu bestimmen, ob irgendwo entlang des Nukleinsäuremoleküls eine unmarkierte Einheit angeordnet ist.

[0270] Nukleinsäuremoleküle können auch nach dem Zwei-Nukleotid-Markierungsschema markiert werden. Sechs Gruppen von zwei nukleotidmarkierten Nukleinsäuremolekülen können verwendet werden, um die Daten aufzulösen und die Nukleotidsequenz zu interpretieren. Ambrose et al., 1993, und Harding und Keller, 1992, haben die Synthese von großen fluoreszierenden DNA-Molekülen gezeigt, wobei zwei der Nukleotide vollständig extrinsisch markiert waren. Die durchschnittliche Größe der Moleküle betrug 7 kb. Sechs verschiedene Kombinationen von Zwei-Nukleotid-Markierung sind nach der folgenden Formel möglich:

$$({}_n C_k) = \frac{n!}{k!(n-k)!} = \frac{4}{2!2!} = 6$$

wobei n Nukleotide jeweils k mal genommen werden. Die möglichen Kombinationen sind AC, AG, AT, CG, CT und GT. Die Kenntnis der Reihenfolge der Markierungen in jeder der Gruppen ermöglicht die erfolgreiche Rekonstruktion der Nukleinsäuresequenz. Unter Verwendung eines 4-mers (5'ACGT'3) als Modellsequenz kann die Theorie demonstriert werden. Die erste Gruppe, AC, ergibt die Information, daß ein C nach dem A vorhanden sein muß. Das ergibt weder eine Information über die Zahl der Nukleotide zwischen A und C, noch ergibt dies eine Information über irgendwelche Gs oder Ts, die dem A vorangehen. Die zweite Gruppe, AG, zeigt, daß auch ein G auf das A folgt. Die Gruppe AT zeigt, daß ein T auf das A folgt. Aus diesen drei Gruppen ist es daher bekannt, daß die Ziel-DNA ein 4-mer ist und daß ein C, ein G und ein T dem A folgen. Die nachfolgenden Gruppen ergeben Informationen über die Reihenfolge dieser drei Nukleotide nach dem A. Die Gruppe CG zeigt, daß G auf C folgt. Die Gruppe CT zeigt, daß T auf C folgt. Die Gruppe GT schließt die Anordnung ab und ergibt die endgültige entzifferte Sequenz von 5'ACGT'3. Über das sechs markierte Gruppen nutzende Verfahren hinaus kann die Sequenz durch Kombination von Informationen über den Abstand zwischen markierten Nukleotiden, die wie oben beschrieben detektierbare Signale erzeugen, und Informationen, die von weniger als sechs Gruppen zweier nukleotidmarkierter Nukleinsäuremoleküle erhalten wurde, ermittelt werden.

[0271] Ein viertes Markierungsschema, das Zufalls-Ein-Nukleotid-Markierungsschema kann ebenfalls verwendet werden. Bei diesem Verfahren werden Distanzinformationen, die entweder durch Populationsanalyse und/oder die momentane Geschwindigkeit der DNA-Bewegung erhalten werden, zur Bestimmung der Zahl der Nukleotide eingesetzt, die zwei markierte Nukleotide trennen. Die Analyse von vier verschieden markierten Zielmolekülen ergibt die vollständige Sequenz.

[0272] Ein Analyseverfahren bei diesen Markierungsverfahren beinhaltet die Verwendung von Informationen

zu komplementären Basen. **Fig. 1** zeigt eine Markierungsstrategie, bei der zwei verschieden markierte DNA-Proben erforderlich sind. Die erste Probe weist zwei seiner nicht-komplementären Basen zufallsmarkiert mit demselben Fluorophor auf. Nicht-komplementäre Basenpaare sind AC, AG, TC und TG. Bei der zweiten Probe ist eine der Basen zufallsmarkiert. Die für die zweite Probe ausgewählte Base jede der vier Basen sein. In dem gegebenen Beispiel sind die zwei nicht-komplementären Basen zu A und C gewählt. Im Ergebnis werden zwei Proben hergestellt, eine mit markierten As und Cs und eine andere mit markierten As. Die DNA wird genomisch verdaut, endmarkiert, gereinigt und durch Nanokanal-FRET-Sequenzierung analysiert. Die sequenzspezifische FRET-Information, die von jedem Fragment stammt, wird in eine von zwei Komplementärstrang-Gruppen sortiert. Die Sortierung ermöglicht eine Populationsanalyse zur Bestimmung der Positionen aller gewünschten Basen. Die Figur stellt die Erzeugung von Sequenzinformationen aus den sortierten Daten dar. Die erste Gruppe von analysierten Informationen ergibt die Positionen aller As und Cs auf einem Strang. Die zweite analysierte Gruppe ergibt Kenntnisse zu allen As und Cs auf einem Strang. Dasselbe Verfahren wird auf den komplementären Strang angewendet. Die Kenntnis der As und Cs des komplementären Strangs ist identisch zur Kenntnis der Ts und Gs auf dem anderen Strang. Das Ergebnis ist eine Sequenzrekonstruktion. Um die Sequenz gegenzuprüfen, kann der Vorgang für die anderen Paare von nichtkomplementären Basen wie beispielsweise TG, TC und AG wiederholt werden.

[0273] Es gibt zwei Verfahren zur Bestimmung des Abstandes zwischen Basen. Eines erfordert die Bestimmung der momentanen DNA-Bewegungsgeschwindigkeit, die leicht aus der Dauer des Energietransfers oder der Dämpfung für eine bestimmte Markierung ermittelt werden kann. Ein anderes beinhaltet die Analyse einer Population von Ziel-DNA-Molekülen und deren entsprechende Gaussische Abstandsverteilungen.

[0274] Das Verfahren zur Bestimmung der momentanen Geschwindigkeit beinhaltet die Feststellung der Abstandstrennung auf Basis der bekannten momentanen DNA-Bewegungsgeschwindigkeit (v), multipliziert mit der Zeit der Trennung zwischen den Signalen (t). Die momentane Geschwindigkeit wird durch Messung der Zeit gefunden, die es dauert, bis ein markiertes Nukleotid die Wechselwirkungsstation passiert. Da die Länge der konzentrierten Mittelfläche (d) bekannt ist (durch Kalibrierung und physikalische Messung des lokalisierten Bereichs des Mittels, z. B. die Dicke einer konzentrierten Donor-Fluorophorfläche), ist die Geschwindigkeit einfach $v = d/t$. Wie in **Fig. 2** gezeigt, ergibt die Analyse der Rohdaten, die die Änderungen in den aus den sequentiellen detektierbaren Signalen resultierenden Energieemissionsmustern zeigen, bei graphischer Darstellung eine Kurve, die von links nach rechts zwei Energieintensitätsabnahmen gefolgt von zwei Energieintensitätszunahmen zeigt. Das Plateau von der ersten Energieintensitätsabnahme (bezeichnet als t_1) beträgt das Doppelte der zweiten Energieintensitätsabnahme (bezeichnet als t_2). Die Länge der Wechselwirkungsstation ist als 51 Å gegeben. Aus dieser gegebenen Information ist die Zahl der markierten Nukleotide bekannt. Darüber hinaus wird der Trennungsabstand der beiden durch Inbeziehungsetzen der Geschwindigkeit der DNA-Bewegung zur Zeit der Donor-Intensitäts-Plateaus bestimmt.

[0275] Die Zahl der markierten Nukleotide wird einfach durch die Zahl der Intensitätsabnahmen angegeben. In **Fig. 2** gibt es zwei Intensitätsabnahmen. Entsprechend müssen zwei detektierbare Marker auf der DNA vorhanden sein. Um den Abstand der Basentrennung zu bestimmen, ist es erforderlich, die momentane DNA-Bewegungsgeschwindigkeit festzustellen, die durch Kenntnis der Zeit, die ein markiertes Nukleotid benötigt, um den lokalisierten Bereich des Mittels zu überqueren, und der Länge des lokalisierten Bereichs des Mittels, ermittelt wird. Die Länge des lokalisierten Bereichs des Mittels ist zu 51 Å gegeben. Die Zeit, die ein markiertes Nukleotid benötigt, um den lokalisierten Bereich des Mittels zu überqueren, wird begrenzt durch die erste Intensitätsabnahme und die erste Intensitätszunahme (gekennzeichnet durch den grau schattierten Bereich, 7,5 s). Die Geschwindigkeit der DNA-Bewegung ist 6,8 Å/s. Die Basentrennung wird abgeleitet aus der Zeit, die die markierten Nukleotide trennt ($t_1 = 5$ s) multipliziert mit der Geschwindigkeit (6,8 Å), was 10 Basenpaaren entspricht. Als Mittel zur Gegenprüfung, $51 \text{ Å} - t_2 v$ ergibt ebenfalls die Basentrennung.

[0276] Bei dem Populationsverfahren wird die ganze Population von markierten Nukleotiden berücksichtigt. Die für das Geschwindigkeitsverfahren erforderliche Kenntnis der Länge des lokalisierten Bereichs des Mittels und der momentanen Geschwindigkeit ist nicht notwendig. Der Einsatz des Populationsverfahrens eliminiert das Erfordernis von präzisen Messungen bei individuellen Nukleinsäuremolekülen statistisch.

[0277] Ein Beispiel für eine Populationsanalyse unter Verwendung von fünf Nukleinsäuremolekülen, die jeweils einen Nanokanal durchqueren, wird unten beschrieben. Fünf Moleküle, die eine Population von identischen DNA-Fragmenten repräsentieren, werden hergestellt. In einem konstanten elektrischen Feld sollte die Zeit zwischen der Detektion des ersten und zweiten markierten Nukleotids für alle DNA-Moleküle identisch sein. Unter Versuchsbedingungen unterscheiden sich die Zeiten leicht, was zu einer Gaussischen Verteilung der Zeiten führt. Der Höhepunkt der Gaussischen Verteilung ist charakteristisch für den Trennungsabstand (d)

zwischen zwei markierten Nukleotiden.

[0278] Ein weiteres Beispiel, bei dem eine Population von Ein-Nukleotid-zufallsmarkierten Nukleinsäuremolekülen (sechs Moleküle bilden die Population) verwendet wird, veranschaulicht ferner das Konzept der Populationsanalyse und die Bestimmung von Distanzinformationen. Die Nukleinsäure wird endmarkiert, um einen Referenzpunkt bereitzustellen. Mit genügend Nukleinsäuremolekülen kann der Abstand zwischen zwei beliebigen As festgestellt werden. Zwei als Subpopulation betrachtete Moleküle vermitteln die Basentrennung zwischen der Endmarkierung und dem zweiten A und auch zwischen dem zweiten und dritten A. Die Trennungszeiten werden verwendet, um Verteilungen zu erzeugen, die für den Basenabstand repräsentativ sind. Bei denselben zwei Molekülen werden Verteilungen von 4 und 6 Basentrennungen erzeugt. Durch Anwendung derselben Logik auf den Rest der Population können die Positionen aller As in der DNA bestimmt werden. Die vollständige Sequenz wird durch Wiederholen des Vorgangs für die anderen drei Basen (C, G und T) erzeugt.

[0279] Über die Markierung aller Einheiten einer Art hinaus ist es möglich, ein Ein-Nukleotid-Markierungsschema zu verwenden, bei dem nicht jedes Nukleotid einer Art markiert ist. Eine Zusammenfassung dieses Verfahrens ist in **Fig. 3** dargestellt, die eine repräsentative Population von zufalls-A-markierten Fragmenten für ein 16-mer mit der Sequenz 5'ACGTACGTACGTACGT'3 darstellt. Bei jedem individuell markierten DNA-Molekül ist die Hälfte seiner As zusätzlich zu 5'- und 3'-Endmarkierungen markiert. Mit einer großen Population von zufallsmarkierten Fragmenten kann der Abstand zwischen allen aufeinanderfolgenden As in der Ziel-DNA festgestellt werden. Die Endmarkierungen dienen dazu, den Abstand zwischen den Enden der DNA und dem ersten A zu bestimmen. Die Wiederholung derselben Analyse für die anderen Nukleotide erzeugt die Sequenz des 16-mers. Die Vorteile der Verwendung eines solchen Verfahrens beinhalten das Fehlen sterischer Effekte und die Einfachheit der Markierung. Dies Art der Markierung wird als Zufallsmarkierung bezeichnet. Ein Polymer, das "zufallsmarkiert" ist, ist ein Polymer, bei dem weniger als alle von einem bestimmten Typ von Einheit markiert sind. Es ist unbekannt, welche Einheiten eines bestimmten Typs eines zufallsmarkierten Polymers markiert sind.

[0280] Wie oben kurz erwähnt, können verschiedene Kombinationen der Markierungsschemata zusammen verwendet werden. Bei all den oben aufgeführten Verfahren werden entweder geordnete lineare Informationen von Signalen oder Abstandsinformationen zwischen Nukleotiden berücksichtigt. Dies zwei Aspekte können kombiniert werden, um ein Verfahren zu erhalten, das sowohl auf geordneten linearen Informationen als auch auf Distanzinformationen beruht. Zum Beispiel kann eine Ein-Nukleotid-Zufallsmarkierungsstrategie auf eine Vier-Nukleotid-Zufallsmarkierungsstrategie ausgedehnt werden. Vier-Nukleotid-Zufallsmarkierung liegt vor, wenn ein Teil aller vier Nukleotide markiert ist. Bei eine Population von Molekülen ist ein Teil der vier Nukleotide markiert. Jedes der vier Nukleotide weist eine einzigartige Markierung auf. Die Analyse einer zufallsmarkierten Population führt zur Erzeugung der Sequenzdaten.

[0281] Die Verwendung von doppelsträngiger DNA ermöglicht Variationen. Ein Einzelstrang-Zwei-Nukleotid-Markierungsschema kann vorgenommen werden, wenn zwei der Nukleotide auf einem DNA-Strang vollständig durch markierte Nukleotide ersetzt werden. Um die sterischen Behinderungen, die durch zwei extrinsisch markierte Nukleotide auferlegt werden, und die Theorie hinter der Zwei-Nukleotid-Markierung beizubehalten, ist es möglich, ein Nukleotid auf jedem der komplementären Stränge vollständig zu markieren, um dasselbe Ergebnis zu erlangen. Dieses Verfahren beinhaltet die Verwendung doppelsträngiger DNA, bei der jeder Strang mit einem anderen Marker markiert ist. Sechs verschieden markierte Duplex-DNA-Gruppen erzeugen einen Datensatz, der ausreicht, um Sequenzinformationen bereitzustellen. Bei jedem komplementären Strang von DNA sollte eines der Nukleotide markiert sein. Bei jeder Duplex-DNA-Gruppe wird das Äquivalent von zwei verschiedenen Nukleotiden (mögliche Kombinationen sind AC, AG, AT, CG, CT, GT) markiert. Wenn beide komplementären Stränge die Adenine markiert haben, entspricht dies der Kombination AT. Der Vorteil bei der Zwei-Nukleotid-Duplex-Markierung ist, daß nur ein Nukleotid auf jedem Strang markiert ist, was die Synthese längerer markierter Stränge im Vergleich zur Zwei-Nukleotid-Markierung an Einzelstrang-DNA ermöglicht. In der Praxis ist gezeigt worden, daß die Synthese von DNA-Fragmenten mit einem vollständig markierten Nukleotid mit Längen von mehr als 10 kb erreicht werden kann (Ambrose et al., 1993; Harding und Keller, 1992).

[0282] Eine Verwendung der erfindungsgemäßen Verfahren ist die Bestimmung der Sequenz von Einheiten innerhalb eines Polymers. Die Identifizierung der Sequenz von Einheiten eines Polymers, wie beispielsweise einer Nukleinsäure, ist ein wichtiger Schritt zum Verständnis der Funktion des Polymers und zur Feststellung der Rolle des Polymers in einer physiologischen Umgebung wie beispielsweise einer Zelle oder einem Gewebe. Die derzeit verwendeten Sequenzierungsverfahren sind langsam und mühsam. Die erfindungsgemäßen Verfahren sind sehr viel schneller und erzeugen wesentlich mehr Sequenzdaten in einer sehr kurzen Zeitspanne.

[0283] Die Sequenzierung eines Polymers kann die Sequenzierung des ganzen Polymers oder Teilen des Polymers oder selbst die Identifikation einer individuellen Einheit in dem Polymer umfassen. Ein Verfahren zur Identifizierung einer individuellen Einheit eines Polymers beinhaltet die Schritte des vorübergehenden Aussetzens der individuellen Einheit des Polymers, dessen Identität unbekannt ist, einem Mittel gegenüber, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle zur Hervorrufung einer Wechselwirkung mit einem detektierbaren Signal, das charakteristisch ist für die individuelle Einheit, und des Detektierens und Unterscheidens des Signals von Signalen, die von benachbarten signalerzeugenden Einheiten des Polymers erzeugt werden als Hinweis auf die Identität der individuellen Einheit.

[0284] Die individuelle Einheit wird dem Mittel "vorübergehend ausgesetzt", um ein detektierbares Signal zu erzeugen, das charakteristisch für die individuelle Einheit ist. "Vorübergehend ausgesetzt" wie hier verwendet bedeutet, daß die Einheit über eine ausreichende Zeit in Wechselwirkungsnähe zu dem Mittel angeordnet ist, um ein Signal hervorzurufen und dann aus der Wechselwirkungsnähe bewegt wird. Die genaue Zeitspanne, die benötigt wird, um ein Signal hervorzurufen, wird von der individuellen Einheit und dem jeweiligen Mittel abhängen, im allgemeinen liegt die Zeitspanne zwischen einer Nanosekunde und einer Sekunde.

[0285] Das für die individuelle Einheit charakteristische Signal wird von anderen Signalen, die von benachbarten signalerzeugenden Einheiten des Polymers hervorgerufen werden unterschieden. Eine "benachbarte signalerzeugende Einheit" ist die der individuellen Einheit am nächsten liegende Einheit, die bei Exposition gegenüber dem Mittel ein detektierbares Signal erzeugt. Dies ist nicht notwendigerweise die Einheit, die direkt mit der individuellen Einheit verbunden ist, sofern die direkt verbundene Einheit nicht (intrinsisch oder extrinsisch) markiert ist und ein detektierbares Signal hervorruft.

[0286] Für den Fall, daß das Mittel ein oder mehrere Fluorophore ist, ist die Wechselwirkungsnähe zwischen dem Mittel und der Einheit die Energietransfernähe und das erzeugte Signal ist Fluoreszenzresonanzenergietransfer. "Energietransfernähe" wie hier verwendet ist der Abstand zwischen der Einheit und dem Fluorophor, der eine Wechselwirkung zwischen zwei komplementären Quellen ermöglicht, wenn eine Quelle mit dem Absorptionsspektrum der anderen Quelle überlappt. "Fluoreszenzenergietransfer" wie hier verwendet ist der Transfer von Photonenenergie zwischen Fluorophoren mit überlappenden Emissions- und Absorptionsspektren.

[0287] Ein anderes Verfahren zur Identifizierung einer individuellen Einheit eines Polymers beinhaltet die Schritte des vorübergehenden Bewegens der individuellen Einheit des Polymers relativ zu einer Station, wobei die Identität der individuellen Einheit unbekannt ist, des Detektierens eines Signals, das bei einer detektierbaren physikalischen Änderung in der Einheit oder der Station entsteht, und des Unterscheidens des Signals von Signalen, die bei der Exposition von benachbarten signalerzeugenden Einheiten des Polymers der Station gegenüber entstehen, als Hinweis auf die Identität der individuellen Einheit.

[0288] Nach einem Aspekt können die erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, eine, einige oder alle Einheiten des Polymers zu bestimmen. Dies wird erreicht durch Identifizieren der Art der individuellen Einheit und seiner Position im Rückgrat des Polymers durch die Feststellung, ob ein Signal, das an der jeweiligen Position in dem Rückgrat detektiert wird, für die Anwesenheit der jeweiligen markierten Einheit charakteristisch ist.

[0289] Die erfindungsgemäßen Verfahren sind geeignet zur Identifizierung anderer struktureller Eigenschaften des Polymers. Die durch Analyse eines Polymers nach den erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen strukturellen Eigenschaften können die Identifizierung charakteristischer Eigenschaften des Polymers beinhalten, was (wiederum) zum Beispiel die Identifizierung der Anwesenheit eines Polymers in einer Probe oder die Feststellung der Verwandtschaft von Polymeren untereinander, die Identifizierung der Größe des Polymers, die Identifizierung der Nähe oder Distanz zwischen einem oder mehreren individuellen Einheiten des Polymers, die Identifizierung der Reihenfolge von zwei oder mehr individuellen Einheiten innerhalb des Polymers und/oder die Identifizierung der allgemeinen Zusammensetzung der Einheiten des Polymers ermöglicht. Solche Eigenschaften sind für eine Vielzahl von Zwecken wie beispielsweise die Feststellung der Anwesenheit oder Abwesenheit eines bestimmten Polymers in einer Probe. Für den Fall, daß das Polymer eine Nukleinsäure ist, können die erfindungsgemäßen Verfahren zum Beispiel eingesetzt werden, um festzustellen, ob eine bestimmte Gensequenz in einer Zelle oder einem Gewebe exprimiert wird. Die Anwesenheit oder Abwesenheit einer bestimmten Sequenz kann ermittelt werden durch Feststellen, ob irgendein Polymer in der Probe ein charakteristisches Muster individueller Einheiten zeigt, das nur in dem interessierenden Polymer gefunden wird, d. h. durch Vergleichen der detektierten Signale mit einem bekannten Muster von Signalen, das charakteristisch

für ein bekanntes Polymer ist, um die Verwandtschaft des analysierten Polymers zu dem bekannten Polymer zu bestimmen. Die vollständige Sequenz des interessierenden Polymers muß nicht bestimmt werden, um die Anwesenheit oder Abwesenheit des Polymers in der Probe festzustellen. Gleichermäßen können die Verfahren geeignet sein, die von einem Polymer detektierten Signale mit einem Muster von Signalen von einem anderen Polymer zu vergleichen, um die Verwandtschaft der zwei Polymere zu bestimmen.

[0290] Die Nähe zu oder der Abstand zwischen zwei individuellen Einheiten eines Polymers können nach den erfindungsgemäßen Verfahren festgestellt werden. Es ist aus mehreren Gründen wichtig, die Nähe zu oder den Abstand zwischen zwei Einheiten zu bestimmen. Jede Einheit des Polymers besitzt eine bestimmte Position in dem Rückgrat. Die Sequenz von Einheiten dient als Blaupause für ein bekanntes Polymer. Der Abstand zwischen zwei oder mehr Einheiten bei einem unbekanntem Polymer kann mit der Blaupause eines bekannten Polymers verglichen werden, um festzustellen, ob sie miteinander verwandt sind. Darüber hinaus ist die Fähigkeit, den Abstand zwischen zwei Einheiten zu bestimmen, wichtig für die Feststellung, wie viele Einheiten, wenn überhaupt, zwischen zwei interessierenden Einheiten liegen.

[0291] Um die Nähe zweier individueller Einheiten eines Polymers aus verknüpften Einheiten zu bestimmen, wird das Polymer relativ zu einer Station bewegt, wobei jede individuelle Einheit der Station gegenüber ausgesetzt wird, um ein charakteristisches Signal zu erzeugen, das bei einer detektierbaren physikalischen Änderung in der Einheit oder der Station entsteht. Jedes der erzeugten charakteristischen Signale wird dann detektiert, und die Zeitspanne, die zwischen der Detektion jedes charakteristischen Signals vergeht, wird wie oben beschrieben gemessen. Die verstrichene Zeitspanne bildet einen Hinweis auf die Nähe der zwei Einheiten. Die Station kann eine Wechselwirkungsstation sein und die Einheit kann einem Mittel gegenüber ausgesetzt werden, um ein elektromagnetisches Signal zu produzieren.

[0292] Ein "für eine Wechselwirkung charakteristisches Signal" wie hier verwendet ist ein Signal, von dem angenommen wird, daß es aus einer Wechselwirkung zwischen der Station und einer bestimmten markierten Einheit resultiert. Das erzeugte spezifische Signal hängt von der Art der Station sowie der Art der markierten Einheit ab. Wenn die Station zum Beispiel ein Mittel ist, das elektromagnetische Strahlung ist, und die markierte Einheit ein Fluorophor ist, dann wird die Wechselwirkung zwischen den beiden zur Emission von elektromagnetischer Strahlung durch das Fluorophor bei einer Wellenlänge, bei der das Fluorophor bekanntermaßen emittiert, führen. Wenn die Station ein Mittel ist, das eine Szintillationsschicht ist, und die Einheit radioaktiv ist, dann wird die Wechselwirkung zwischen den beiden zur Emission von elektromagnetischer Strahlung in Form von Fluoreszenz führen.

[0293] Es ist möglich, die Reihenfolge der Einheiten eines Polymers unter Verwendung der erfindungsgemäßen Verfahren zu bestimmen. Nach einem Aspekt der Erfindung kann die Reihenfolge von zwei individuellen Einheiten eines Polymers festgestellt werden, indem das Polymer linear in bezug auf eine Station bewegt wird und zwei der individuellen Einheiten der Station gegenüber ausgesetzt werden, um erste und zweite detektierbare Signale zu erzeugen, die aus einer physikalischen Änderung in der Station oder der Einheit entstehen.

[0294] Auch die allgemeine Zusammensetzung der Einheiten des Polymers kann durch die erfindungsgemäßen Verfahren bestimmt werden. Wenn das Polymer beispielsweise eine Nukleinsäure ist, können die erfindungsgemäßen Verfahren Informationen über den Prozentanteil von Purinen zu Pyrimidinen oder den Prozentanteil von A, C, T und G in der Nukleinsäure bereitstellen.

[0295] Quantitative Informationen über die Größe der Probe können durch die erfindungsgemäßen Verfahren ebenfalls bestimmt werden. Beispielsweise kann die Größe eines Polymers durch Bestimmung der Zahl von individuellen Einheiten bestimmt werden, die das Polymer aufbauen. Die Zahl der Einheiten, die das Polymer aufbauen, kann durch Messung der Zeit bestimmt werden, die erforderlich ist, damit das vollständige Polymer ein Mittel oder eine Wechselwirkungsstelle in einer linearen Weise passiert und Teilen derselben durch die durchschnittliche Zeitspanne, die eine individuelle Einheit dieses bestimmten Typs Polymer benötigt, um die Stelle zu passieren.

[0296] Zusätzlich zu Informationen über eine bestimmte Einheit können die erfindungsgemäßen Verfahren auch verwendet werden, um mehr als eine Einheit zur Zeit zu identifizieren, um Informationen über ein Polymer bereitzustellen. In einem Aspekt wird das Verfahren durchgeführt durch Bereitstellen eines markierten Polymers aus verbundenen Einheiten, Detektieren von Signalen von markierten einheitsspezifischen Markern von weniger als allen verbundenen Einheiten und Speichern einer Signatur der detektierten Signale, um das Polymer zu analysieren. Bei diesem Aspekt der Erfindung kann jede Einheit des markierten Polymers mit einem einheitsspezifischen Marker markiert sein oder weniger als alle Einheiten können mit einem einheitsspezifischen

schen Marker markiert sein.

[0297] Das Verfahren ist besonders geeignet zur gleichzeitigen Analyse mehrerer Einheiten eines Polymers. Dies wird erreicht durch Verwenden eines einheitsspezifischen Markers, der markiert ist und der mit mehr als einer Einheit in einer sequenzspezifischen Weise wechselwirkt. Ein "einheitsspezifischer Marker" wie hier verwendet ist eine Verbindung, die mit einer oder mehreren Einheiten eines Polymers spezifisch wechselwirkt und in der Lage ist, diese Einheiten zu identifizieren. Beispielsweise kann ein einheitsspezifischer Marker für eine Nukleinsäure ein markiertes Dimer, Trimer etc. sein, das an eine spezifische Sequenz von Basen wie beispielsweise TG, AG, ATC etc. bindet. Durch Feststellen der Anwesenheit oder Position des markierten Markers können Strukturinformationen über das Polymer abgeleitet werden. Beispielsweise kann die Anwesenheit des Markers auf einem Polymer die Identität des Polymers ergeben. Dies ermöglicht es, die Anwesenheit oder Abwesenheit eines Polymers in einer Lösung oder Mischung von Polymeren zu bestimmen. Die Reihenfolge, Distanz, Anzahl etc. der Marker auf einem Polymer kann Informationen über die Sequenz oder Zusammensetzung eines Polymers bereitstellen. Andere einheitsspezifische Marker beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf sequenzspezifische Binder der großen und kleinen Furche und Interkalatoren, sequenzspezifische DNA- und peptidbindende Proteine, sequenzspezifische Peptidnukleinsäuren etc. Es gibt viele solcher einheitsspezifischer Marker, die dem Fachmann wohlbekannt sind.

[0298] Diese Art Analyse kann in einer Ausführungsform verwendet werden, um DNA-Fragmente durch Analyse der Hybridisierungsmuster von mehreren Sonden mit einzelnen Fragmenten des Polymers zu identifizieren. Die gegenwärtigen Verfahren des Standes der Technik zur Hybridisierungsanalyse von DNA beruhen auf DNA-Chips. Die erfindungsgemäßen Verfahren sind aus einer Anzahl von Gründen vorteilhaft. Die Anzahl, Art, Reihenfolge und Distanz zwischen den an ein unbekanntes DNA-Fragment gebundenen mehreren Sonden kann bestimmt werden. Diese Information kann verwendet werden, um die Zahl von differentiell exprimierten Genen eindeutig zu identifizieren. Gegenwärtige Hybridisierungsansätze können nur den Typ von Sonden bestimmen, die an ein gegebenes Fragment gebunden sind. Darüber hinaus sind die erfindungsgemäßen Verfahren in der Lage, die aktuelle Zahl bestimmter exprimierter Gene zu quantifizieren. Gegenwärtige Verfahren beruhen auf der Quantifizierung von Fluoreszenzintensitäten, was aufgrund der fehlenden Linearitäten des Detektionssystems oft zu Fehlern führt. Aufgrund der großen Menge von erzeugter Information benötigen die erfindungsgemäßen Verfahren keine Auswahl von zu untersuchenden exprimierten Genen oder unbekanntem Nukleinsäuren. Dies ist im Gegensatz zum Erfordernis verschiedener DNA-Chips für verschiedene zu untersuchende Gene, Gruppen von exprimierten Genen und auch verschiedenen Organismen. Die erfindungsgemäßen Verfahren können die unbekanntem exprimierten Gene durch Computeranalyse der erzeugten Hybridisierungsmuster identifizieren. Die aus der linearen Analyse der DNA-Sonden erhaltenen Daten werden dann mit Informationen aus einer Datenbank in Übereinstimmung gebracht, um die Identität der Ziel-DNA festzustellen. Die Verfahren können auf diese Weise Informationen aus Hybridisierungsreaktionen analysieren, die dann für Diagnosen und zur Bestimmung von Genexpressionsmustern verwendet werden können.

[0299] Eine "Signatur" wie hier verwendet ist ein sequenzspezifisches Signal, das von einem markierten Polymer stammt. Die Signatur beinhaltet Informationen über die Struktur des Polymers. Beispielsweise kann die Signatur eines Polymers durch eine Reihe von aufeinanderfolgenden Einheiten oder durch bestimmte Einheiten, die in einem bestimmten Abstand zueinander angeordnet sind, definiert sein. Die Signatur des Polymers identifiziert das Polymer. Signaturen sind geeignet zur eindeutigen Identifizierung von Fragmenten durch Identifizierung von Basen an bestimmten Positionen entlang eines Stranges von DNA. Die Wahrscheinlichkeit für die Kenntnis irgendeiner Position beträgt $1/4$. Die eindeutige Identifizierung eines Fragments kommt mit ungefähr zwanzig identifizierten Positionen ($1/4^{20} = 9,1 \times 10^{-13}$). Für ein Fragment mit 20 detektierten Markern und 10% Detektion/Markierung muß die Größe des Fragments nur 200 Basenpaare betragen. Die vorgeschlagene Leselänge liegt in der Größenordnung von Kilobasen, was jedes Fragment eindeutig identifizieren sollte. Die Identifizierung von Fragmenten ermöglicht die Gruppierung durch ähnliche Sequenzen, was die Sequenzrekonstruktion durch Populationsanalyse ermöglicht.

[0300] Ein bevorzugtes erfindungsgemäßes Analyseverfahren beinhaltet die Verwendung von radioaktiv markierten Polymeren. Die Art der radioaktiven Emission beeinflusst die Art der verwendeten Detektionsvorrichtung. Grundsätzlich gibt es drei Arten verschiedener Kernstrahlung, einschließlich Alpha-, Beta- und Gammastrahlung. Alpha-Emission verursacht eine starke Ionisation in Stoffen und erlaubt die Einzelzählung durch Ionisationskammern und Proportionalzähler, viel interessanter jedoch kann Alpha-Emission, die mit Stoffen wechselwirkt, auch eine Molekulanregung verursachen, die zur Fluoreszenz führen kann. Die Fluoreszenz wird als Szintillation bezeichnet. Betazerfall, der schwächer ist als Alphazerfall, kann verstärkt werden, um ein angemessenes Signal zu erzeugen. Gammastrahlung entsteht durch interne Umwandlung von Anregungsenergie. Die Szintillationszählung von Gammastrahlen ist effizient und erzeugt ein starkes Signal. Natriumiodidkris-

talle fluoreszieren mit inzidenter Gammastrahlung.

[0301] Eine "Szintillations"-Schicht oder ein "Szintillations"-Material wie hier verwendet ist jede Art von Material, das als Reaktion auf Anregung durch Kernstrahlung fluoresziert oder Licht emittiert. Szintillationsmaterialien sind im Stand der Technik gut bekannt. Aromatische Kohlenwasserstoffe, die Resonanzstrukturen aufweisen, sind ausgezeichnete Szintillatoren. Anthracen und Stilben fallen in die Kategorie solcher Verbindungen. Auch von anorganischen Kristallen ist bekannt, daß sie fluoreszieren. Damit diese Verbindungen lumineszieren, müssen die anorganischen Kristalle kleine Mengen von Unreinheiten enthalten, die Energieniveaus zwischen Valenz- und Leitungsbändern erzeugen. Eine Anregung und Anregung kann daher stattfinden. In vielen Fällen kann die Anregung durch phosphoreszierende Photonenemission stattfinden, die zu einer langen Detektionslebensdauer führt. Einige gebräuchliche Szintillatoren beinhalten NaI (TI), ZnS (Ag), Anthracen, Stilben und Kunststoff-Phosphorverbindungen.

[0302] Viele Verfahren zur Messung von Kernstrahlung sind im Stand der Technik bekannt und beinhalten Vorrichtungen wie eine Nebel- und Blaskammer-Vorrichtung, Gleichstrom-Ionenkammern, Impulszähler, Gaszähler (d. h. Geiger-Müller-Zähler), Festphasendetektoren (Oberflächenbarrieredetektoren, lithiumgedriftete Detektoren, intrinsische Germanium-Detektoren), Szintillationszähler, Cerenkov-Detektoren etc.

[0303] Die Analyse von radiomarkierten Polymeren ist identisch zu anderen Mitteln zur Erzeugung polymerabhängiger Impulse. Zum Beispiel kann eine Probe von radiomarkierten As durch das System analysiert werden, um die relativen Abstände von As in einer DNA-Probe zu bestimmen. Die Zeit zwischen der Detektion von Strahlungssignalen ist für das analysierte Polymer charakteristisch. Die Analyse der vier Populationen von markierter DNA (As, Cs, Gs und Ts) kann die Sequenz des analysierten Polymers ergeben. Die Sequenz von DNA kann auch mittels eines komplexeren Schemas analysiert werden, das die Analyse einer Kombination von zweifach markierter DNA und einfach markierter DNA beinhaltet. Die Analyse von einem A- und C-markierten Fragment, gefolgt von der Analyse einer A-markierten Version desselben Fragments ergibt die Kenntnis der Positionen der As und Cs. Die Sequenz ist bekannt, wenn die Prozedur für den komplementären Strang wiederholt wird. Das System kann des weiteren zur Analyse der Größe, Konzentration, Art, Identität, Anwesenheit, Sequenz und Anzahl des Polymers (Polypeptid, RNA, Kohlenhydrat etc.) verwendet werden.

[0304] Die oben beschriebenen Verfahren können an einem einzelnen Polymer oder an mehr als einem Polymer angewendet werden, um Strukturinformationen über das Polymer zu bestimmen. Die Erfindung umfaßt auch die Ausführung der oben beschriebenen Verfahren auf mehrere Polymere. Diese Verfahren und eine Vorrichtung zur gleichzeitigen Anwendung der erfindungsgemäßen Verfahren auf eine Mehrzahl von Polymeren sind unten ausführlich beschrieben.

[0305] Einige der oben beschriebenen Verfahren beruhen auf einer Wechselwirkung, die einen Energietransfer oder eine Dämpfung zur Erzeugung eines detektierbaren Signals beinhalten. Die Beteiligung eines Energietransfers oder einer Dämpfung wird bei einer von zwei Limitierungen bei diesen Ausführungsformen der Erfindung beschrieben. Eine Limitierung ist es, daß das an der Wechselwirkung beteiligte Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle. Die andere Limitierung ist, daß das detektierbare Signal ein Signal aus elektromagnetischer Strahlung ist. Es sollte für einen Fachmann ersichtlich sein, daß jedes der Verfahren die andere Limitierung statt der beschriebenen umfassen kann und dennoch die Neigung der einen Energietransfer oder eine Dämpfung beinhaltenden Wechselwirkung umfaßt. Die Erfindung umfaßt bei diesen Ausführungsformen zum Beispiel über das Umfassen des Verfahrens der Analyse eines Polymers durch Aussetzen der Einheiten des Polymers gegenüber dem aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle ausgewählten Mittel zur Erzeugung eines detektierbaren Signals hinaus auch ein Verfahren zur Analyse eines Polymers durch Aussetzen der Einheiten eines Polymers gegenüber einem Mittel zur Erzeugung eines detektierbaren elektromagnetischen Signals.

[0306] Über die Verfahren beinhaltend einen Energietransfer, eine Dämpfung oder Signale aus elektromagnetischer Strahlung hinaus können die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren auch durch Detektieren eines Signals, das aus einer detektierbaren physikalischen Änderung in der Einheit des Polymers oder der Station hervorgeht, durchgeführt werden. Wie hier verwendet, bedeutet der Ausdruck eine "detektierbare physikalische Änderung" in der Einheit des Polymers oder der Station jede Art Änderung, die in der Einheit des Polymers oder der Station als Folge der Exposition der Einheit der Station gegenüber auftritt. Sobald die Einheit der Station gegenüber ausgesetzt wird, wird ein detektierbares Signal erzeugt. Die Station kann zum Beispiel eine Wechselwirkungsstation oder eine Signalerzeugungsstation sein, die hier jeweils ausführlich beschrieben werden. Die Art von Änderung, die in der Station oder der Einheit zur Erzeugung des detektierbaren

Signals auftritt, hängt von der Art der Station und der Art der Einheit ab. Mehrere Beispiele von Station-Einheit-Kombinationen, die eine Änderung durchmachen, um ein detektierbares Signal zu erzeugen, werden hier zu Beispielszwecken beschrieben. Der Fachmann wird in der Lage sein, andere Station-Einheit-Kombinationen abzuleiten, die innerhalb des Bereichs der Erfindung liegen.

[0307] Wenn die Wechselwirkung zwischen der Station und der Einheit des Polymers auf einem Energietransfer beruht, können sowohl die Einheit oder die Station oder beide eine physikalische Änderung durchmachen, um das Signal zu erzeugen. Bei einer Ausführungsform kann die Station Energie an die Einheit übertragen, um die Einheit zu veranlassen, ein einheitsspezifisches Energiesignal zu emittieren. Die in der Einheit auftretende physikalische Änderung ist die Folge einer Änderung im Energiezustand. Bei anderen Ausführungsformen kann die Einheit Energie an die Station übertragen, um die Station zu veranlassen, ein einheitsspezifisches Signal zu emittieren, das aus dem spezifischen Energietransfer resultiert. Bei einer weiteren Ausführungsform kann eine Partnerverbindung die ein Signal erzeugende physikalische Änderung verursachen. Wenn die Wechselwirkung zwischen einer radioaktiven Einheit und einer Station auftritt, ändert sich die Einheit physikalisch durch Freisetzung von Energie.

[0308] Ein anderer Aspekt der Erfindung umfaßt Verfahren zur Analyse einer Mehrzahl von Polymeren. Jedes der Polymere wird sequentiell analysiert, indem Wechselwirkungen von Einheiten einer Mehrzahl von Polymeren an einer Signalerzeugungsstation detektiert werden. Diese Verfahren beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf ein Verfahren zur Charakterisierung eines Testpolymers, ein Verfahren zur Sequenzierung eines Polymers, ein Verfahren zur Bestimmung der Reihenfolge von Einheiten eines Polymers, ein Verfahren zur Bestimmung des Abstandes zwischen Einheiten eines Polymers und der Analyse einer Gruppe von Polymeren. Diese Verfahren umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Wechselwirkungen, die aus einem Energietransfer oder einer Dämpfung resultieren.

[0309] Ein Verfahren zur Charakterisierung eines Testpolymers wird durchgeführt durch Erhalten von polymerabhängigen Impulsen für jedes der Mehrzahl von Polymeren, Vergleichen der polymerabhängigen Impulse der mehreren Polymere, Bestimmen der Verwandtschaft der Polymere basierend auf Ähnlichkeiten zwischen den polymerabhängigen Impulsen und Charakterisieren des Testpolymers auf Grundlage der polymerabhängigen Impulse von verwandten Polymeren.

[0310] Ein "polymerabhängiger Impuls" wie hier verwendet ist eine detektierbare physikalische Größe, die Information über die Struktureigenschaften von nur einer einzelnen Einheit eines Polymers überträgt oder vermittelt. Die physikalische Größe kann in jeder Form vorliegen, die detektierbar ist. Zum Beispiel kann die physikalische Größe elektromagnetische Strahlung, chemische Leitfähigkeit, elektrische Leitfähigkeit etc. sein. Der polymerabhängige Impuls kann aus einem Energietransfer, einer Dämpfung, Änderungen der Leitfähigkeit, mechanischen Änderungen, Widerstandsänderungen oder irgendwelchen anderen physikalischen Änderungen hervorgehen. Obwohl der polymerabhängige Impuls spezifisch für eine bestimmte Einheit ist, wird ein Polymer mit mehr als einer von einer bestimmten markierten Einheit mehr als einen identischen polymerabhängigen Impuls aufweisen. Zusätzlich kann jede Einheit eines bestimmten Typs verschiedene polymerabhängige Impulse hervorrufen, wenn sie verschiedene Marker tragen.

[0311] Das zur Detektion des polymerabhängigen Impulses verwendete Verfahren hängt von der Art der erzeugten physikalischen Größe ab. Wenn die physikalische Größe beispielsweise elektromagnetische Strahlung ist, dann wird der polymerabhängige Impuls optisch detektiert. Ein "optisch detektierbarer" polymerabhängiger Impuls wie hier verwendet ist ein lichtbasiertes Signal in Form von elektromagnetischer Strahlung, die durch ein lichtdetektierendes Bildgebungssystem detektiert werden kann. Wenn die physikalische Größe chemische Leitfähigkeit ist, dann wird der polymerabhängige Impuls chemisch detektiert. Ein "chemisch detektierter" polymerabhängiger Impuls ist ein Signal in Form einer Änderung in der chemischen Konzentration oder Ladung wie beispielsweise Ionenleitfähigkeit, die mit Hilfe von Standardverfahren zur Messung chemischer Leitfähigkeit detektiert werden kann. Wenn die physikalische Größe ein elektrisches Signal ist, liegt der polymerabhängige Impuls in Form einer Änderung des Widerstandes oder der Kapazität vor.

[0312] Wie hier verwendet kann die "Verwandtschaft von Polymeren" durch Identifizieren eines charakteristischen Musters eines Polymers, das für das Polymer einzigartig ist, bestimmt werden. Wenn das Polymer beispielsweise eine Nukleinsäure ist, wäre nahezu jede Sequenz aus 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden innerhalb des Polymers ein einzigartiges Kennzeichen dieses Nukleinsäuremoleküls. Jedes andere Nukleinsäuremolekül, das eine identische Sequenz aus 10 Nukleotiden zeigt, würde ein verwandtes Polymer sein.

[0313] Eine "Mehrzahl von Polymeren" sind mindestens zwei Polymere. Vorzugsweise ist eine Mehrzahl von

Polymeren mindestens 50 Polymere und besonders bevorzugt mindestens 100 Polymere.

[0314] Die polymerabhängigen Impulse können jede Art von strukturellen Informationen über das Polymer bereitstellen. Diese Signale können zum Beispiel die ganze oder einen Teil der Sequenz des Polymers, die Reihenfolge von polymerabhängigen Impulsen oder die Zeit der Trennung zwischen polymerabhängigen Impulsen als Hinweis auf die Distanz zwischen den Einheiten bereitstellen.

[0315] Die polymerabhängigen Impulse werden durch Wechselwirkung erhalten, die zwischen der Einheit des Polymers und der Umgebung an einer Signalerzeugungsstation auftritt. Eine "Signalerzeugungsstation" wie hier verwendet ist eine Station, die ein Bereich ist, in dem die Einheit der der Umgebung wechselwirkt, um einen polymerabhängigen Impuls zu erzeugen. In einigen Aspekten der Erfindung resultiert der polymerabhängige Impuls aus dem Kontakt mit einem Mittel, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle, und das mit der Einheit zur Erzeugung eines detektierbaren Signals wechselwirken kann, in einem definierten Bereich. In anderen Aspekten resultiert der polymerabhängige Impuls aus dem Kontakt mit einer chemischen Umgebung, die in der Lage ist, in Antwort auf eine Wechselwirkung mit einem Molekül eine spezifische Änderung in der Leitfähigkeit durchzumachen, in einem definierten Bereich. Wenn ein Molekül mit einer spezifischen Struktur mit der chemischen Umgebung wechselwirkt, tritt eine Änderung in der Leitfähigkeit auf. Die Änderung, die spezifisch ist für die jeweilige Struktur, kann eine zeitliche Änderung sein, z. B. kann die Zeit, die für eine Leitfähigkeitsänderung erforderlich ist, darauf hinweisen, daß die Wechselwirkung eine spezifische Struktur oder eine physikalische Änderung beinhaltet. Eine Änderung in der Intensität der Wechselwirkung kann zum Beispiel ein Hinweis auf eine Wechselwirkung mit einer spezifischen Struktur sein. In anderen Aspekten resultiert der polymerabhängige Impuls aus Änderungen der Kapazität oder des Widerstandes, die durch die Bewegung der Einheit zwischen Mikroelektroden oder Nanoelektroden verursacht wird, die zu der Polymereinheit benachbart angeordnet sind. Die Signalerzeugungsstation kann beispielsweise Mikroelektroden oder Nanoelektroden beinhalten, die auf gegenüberliegenden Seiten zu der Polymereinheit angeordnet sind. Die Änderungen im Widerstand oder der Leitfähigkeit, die als Folge der Bewegung der Einheit an den Elektroden vorbei auftreten, sind für die jeweilige Einheit spezifisch.

[0316] Ein Verfahren zur Bestimmung des Abstandes zwischen zwei individuellen Einheiten wird auch von der vorliegenden Erfindung umfaßt. Um den Abstand zwischen zwei individuellen Einheiten eines Polymers von verbundenen Einheiten zu bestimmen, wird das Polymer veranlaßt, sich linear relativ zu einer Signalerzeugungsstation zu bewegen und ein polymerabhängiger Impuls, der erzeugt wird, wenn jede der zwei individuellen Einheiten die Signalerzeugungsstation passiert, wird gemessen. Jeder der Schritte wird dann für eine Mehrzahl von ähnlichen Polymeren wiederholt. Ein Polymer bewegt sich relativ zu einer Signalerzeugungsstation, wenn sich die Einheiten des Polymers nacheinander an der Signalerzeugungsstation vorbeibewegen.

[0317] Jeder der Schritte wird für eine Mehrzahl von gleichen Polymeren wiederholt, um einen Datensatz zu erzeugen. Der Abstand zwischen zwei individuellen Einheiten kann dann auf der Grundlage der Information, die von der Mehrzahl gleicher Polymere erhalten wurde, durch Analyse des Datensatzes bestimmt werden.

[0318] Das Verfahren beinhaltet auch ein Verfahren zur Identifizierung einer Menge von Polymeren, die eine Markierung beinhalten. Es ist zum Beispiel möglich, die Zahl von Polymeren zu bestimmen, die eine bestimmte Einheit oder Kombination von Einheiten in einer Probe aufweisen. In einer Probe von mRNA kann zum Beispiel die Zahl einer bestimmten mRNA festgestellt werden, die in der Probe vorhanden ist. Dies wird erreicht durch Identifizieren eines Musters oder einer Signatur, die für das gewünschte mRNA-Molekül charakteristisch ist. Die Probe von RNA kann dann nach den erfindungsgemäßen Verfahren analysiert werden und die Zahl von mRNA-Molekülen, die ein bestimmtes Muster oder eine bestimmte Signatur aufweisen, kann bestimmt werden.

[0319] "Ähnliche Polymere" wie hier verwendet sind Polymere, die mindestens einen überlappenden Bereich aufweisen. Ähnliche Polymere können eine homogene Population von Polymeren oder eine heterogene Population von Polymeren sein. Eine "homogene Population" von Polymeren wie hier verwendet ist eine Gruppe von identischen Polymeren. Eine "heterogene" Population von ähnlichen Polymeren ist eine Gruppe von ähnlichen Polymeren, die nicht identisch sind, aber mindestens einen überlappenden Bereich identischer Einheiten aufweisen. Ein überlappender Bereich besteht aus mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden. In einigen Fällen besteht ein überlappender Bereich aus mindestens 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 oder 22 aufeinanderfolgenden Nukleotiden.

[0320] Eine "Mehrzahl von ähnlichen Polymeren" sind zwei oder mehrere ähnliche Polymere. Bevorzugt ist

eine Mehrzahl von ähnlichen Polymeren 50 oder mehr ähnliche Polymere. Besonders bevorzugt ist eine Mehrzahl von ähnlichen Polymeren 100 oder mehr ähnlich Polymere.

[0321] Ein "Datensatz" wie hier verwendet ist eine Gruppe von Informationen, die die polymerabhängigen Impulse, die durch ähnliche Polymere erzeugt werden, definiert. Der Datensatz wird wie oben beschrieben analysiert und das Analyseverfahren hängt von der Art des Markierungsschemas ab, das zur Erzeugung der markierten Polymere verwendet wurde. Nukleinsäuresequenzierung ist eine besonders bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren.

[0322] Gegenwärtig sind weniger als 5% des menschlichen Genoms sequenziert. Dies ist nur ein kleiner Teil des Ideals in der Kenntnis der menschlichen Sequenzen, welches die Sequenz aller Individuen ist. Als Beispiel existieren für die menschliche Population $1,4 \times 10^{19}$ (5 Milliarden Menschen $\times 3 \times 10^9$ Basen/Person). Bis jetzt sind nur 2×10^{-10} Prozent der gesamten menschlichen genetischen Information bekannt. Die Geschwindigkeit der Sequenzierung des menschlichen Genoms durch alle weltweiten Anstrengungen liegt grob bei $3 \times 10^9/15$ Jahre, oder 550.000 Basen/Tag, zu Kosten von $> 1\$/\text{Base}$. Die Sequenzierung nach den erfindungsgemäßen Verfahren wird einen außerordentlichen Durchbruch in der Geschwindigkeit der Sequenzierung schaffen. Die vorhergesagte Zeitdauer für die Vervollständigung eines menschlichen Genoms mit einer Maschine beträgt ~15 Stunden. Mehrere parallele dynamische Arrays werden in der Lage sein, die Sequenz eines menschlichen Genoms im Bruchteil einer Stunde zu sequenzieren.

[0323] Ein Verfahren zur Sequenzierung eines Polymers aus verbundenen Einheiten ist ebenfalls von der Erfindung umfaßt. Das Verfahren wird durchgeführt durch Erhalten eines polymerabhängigen Impulses von jedem einer Mehrzahl von überlappenden Polymeren, wobei mindestens ein Teil jedes Polymers eine Sequenz aus verbundenen Einheiten aufweist, die identisch zu den anderen Polymeren ist, und Vergleichen der polymerabhängigen Impulse, um eine Sequenz von verbundenen Einheiten zu erhalten, die bei der Mehrzahl der Polymere identisch ist.

[0324] Die Mehrzahl von überlappenden Polymeren ist eine Gruppe von Polymeren, bei der bei jedem Polymer mindestens ein Teil seiner Sequenz von verbundenen Einheiten identisch zu der Sequenz von anderen Polymeren ist. Der Anteil der Sequenz, der identisch ist, wird als überlappende Bereich bezeichnet und beinhaltet mindestens zehn aufeinanderfolgende Einheiten.

[0325] In einem anderen Aspekt der Erfindung kann die Reihenfolge von Einheiten eines Polymers aus verbundenen Einheiten bestimmt werden durch Bewegen des Polymers linear relativ zu einer Signalerzeugungsstation und Messen eines polymerabhängigen Impulses, der erzeugt wird, wenn jeweils zwei individuelle Einheiten, die jeweils einen polymerabhängigen Impuls hervorrufen, die Signalerzeugungsstation passieren. Diese Schritte werden für eine Mehrzahl von ähnlichen Polymeren wiederholt und die Reihenfolge von mindestens zwei individuellen Einheiten wird auf Grundlage der von der Mehrzahl der ähnlichen Polymere erhaltenen Information bestimmt.

[0326] Ein Verfahren zur Analyse einer Gruppe von Polymeren, bei der jedes der Polymere aus der Gruppe ein individuelles Polymer aus verbundenen Einheiten ist, ist von der Erfindung umfaßt. Das Verfahren beinhaltet den Schritt des Ausrichtens der Gruppe von Polymeren parallel zueinander und des Detektierens eines polymerspezifischen Merkmals des Polymers.

[0327] Die Gruppe von Polymeren werden parallel zueinander ausgerichtet. Die Polymere können durch jedes Mittel ausgerichtet werden, das in der Lage ist, die Polymere zu veranlassen, sich parallel zueinander anzuordnen. Beispielsweise kann ein elektrisches Feld auf die Polymere angewendet werden, um sie dazu zu bringen, in einer parallelen Weise angeordnet zu werden. Bevorzugt erfolgt der Anordnungsschritt in einer Lösung, die frei ist von Gel.

[0328] Ein "polymerabhängiges Merkmal" wie hier verwendet ist jedes strukturelle Merkmal eines Polymers, das mit seiner Sequenz in Beziehung steht. Zum Beispiel beinhaltet ein polymerspezifisches Merkmal Information über das Polymer wie beispielsweise die Länge des Polymers, die Reihenfolge von verbundenen Einheiten in dem Polymer, der Abstand zwischen Einheiten des Polymers, die Nähe von Einheiten in dem Polymer, die Sequenz von einer, einigen oder allen Einheiten des Polymers und die Anwesenheit des Polymers, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0329] Der Schritt des Detektierens des polymerspezifischen Merkmals kann gleichzeitig für alle Polymere durchgeführt werden. Dieser Schritt umfaßt die aufeinanderfolgende Detektion von jeder der Einheiten von al-

len Polymeren. Dies kann erreicht werden, indem jedes der Polymere linear relativ zu einer Mehrzahl von Signalerzeugungsstationen bewegt wird, und die polymerabhängigen Impulse, die bei der Passage des Polymers an der Signalerzeugungsstation vorbei erzeugt werden, detektiert und unterschieden werden.

[0330] Die Erfindung beinhaltet auch ein Verfahren zur Analyse einer Gruppe von Polymeren, wobei jedes Polymer der Gruppe ein individuelles Polymer aus verbundenen Einheiten ist. Das Verfahren wird durchgeführt durch Anordnen der Gruppe von Polymeren in einem elektrischen Feld, gleichzeitiges Bewegen der Gruppe von Polymeren durch entsprechende definierte Kanäle und Detektieren eines polymerspezifischen Merkmals, wenn die Polymere durch die Kanäle bewegt werden. Der Schritt des gleichzeitigen Bewehens der Gruppe von Polymer durch entsprechende Kanäle wird durchgeführt durch Bewegen eines Polymers pro Kanal, so daß jede Einheit die Station einzeln passiert. Mehr als ein Polymer kann zur Zeit in dem Kanal vorhanden sein, wenn die Polymere im Tandem angeordnet sind und nur eine Einheit zur Zeit mit einer Station wechselwirkt.

[0331] Ein "entsprechender definierter Kanal" wie hier verwendet ist ein Kanal, bei die Struktur in einer Weise festgelegt wird, bevor das Polymer in den Kanal eintritt, daß das Polymer bei seiner Passage durch den Kanal einem definierten Pfad folgen wird. Kanäle wie sich in eine Gelmatrix gefunden werden, sind keine entsprechenden definierten Kanäle.

[0332] Die erfindungsgemäßen Verfahren können auch verwendet werden, um einen Resonanzenergietransfer oder eine Dämpfung zwischen zwei interaktiven Partnern, die zu einem solchen Energietransfer oder einer solchen Dämpfung befähigt sind, zu detektieren. Wie hier verwendet ist ein Resonanzenergietransfer (RET) der Transfer von Photonenenergie zwischen zwei Verbindungen mit überlappenden Emmissions- und Absorptionsspektren. Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) ist der Transfer von Photonenenergie zwischen Fluorophoren. Die beiden interaktiven Partner sind alle Verbindungen, die zu einem Energietransfer oder einer Dämpfung in der Lage sind, d. h. lichtemittierende Verbindungen oder Dämpfungsmittel.

[0333] Das Verfahren wird durchgeführt, indem die Partner in ausreichende Nähe gebracht werden, um einen solchen Transfer oder eine solche Dämpfung zu ermöglichen, ein Mittel bei einem der Partner angewendet wird, wobei das Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle, der Fluoreszenzenergietransfer und die Dämpfung, die bei Emission elektromagnetischer Strahlung auftreten und die Wechselwirkung zwischen den Partnern mit einem Materialschild abgeschirmt wird und die emittierte elektromagnetische Strahlung detektiert wird.

[0334] Ein "Materialschild" wie hier verwendet ist jedes Material, das einen Energietransfer oder eine Dämpfung verhindert oder begrenzt. Solch ein Material beinhaltet, ist aber nicht beschränkt auf leitende Materialien, hochindizielle Materialien mit hohem Brechungsindex und lichtundurchlässige Materialien. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Materialschild ein leitender Materialschild. Wie hier verwendet, ist ein "leitender Materialschild" ein Material, das zumindest leitfähig genug ist, um einen Energietransfer zwischen Donor- und Akzeptorquellen zu verhindern.

[0335] Jedes der obigen erfindungsgemäßen Verfahren ist geeignet für mindestens verschiedene Aspekte der Sequenzierung von Polymeren. Alle Verfahren können auch mit den verschiedenen Markierungsschemata verwendet werden, die mit Bezug auf das Verfahren zur Analyse von Polymeren beschrieben wurden.

[0336] Die erfindungsgemäßen Verfahren können durchgeführt werden unter Verwendung jeder Vorrichtung, die ein spezifisches detektierbares Signal für eine individuelle Einheit eines Polymers erzeugt. Eine Art Vorrichtung, die diese Art Analyse ermöglicht, ist eine, die den linearen Transfer eines Polymers vorbei an einer Wechselwirkungsstation oder einer Signalerzeugungsstation unterstützt. Nach einem Aspekt der Erfindung wird ein Herstellungsartikel bereitgestellt, der zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren geeignet ist. Der Herstellungsartikel beinhaltet ein Wandmaterial mit einer Oberfläche, die einen Kanal bildet, ein aus der Gruppe, bestehend aus einer Quelle elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle, einer Schicht lumineszierenden Films und einer Fluoreszenzanregungsquelle ausgewähltes Mittel, das an dem Wandmaterial in der Nähe des Kanals befestigt ist, wobei das Mittel nahe genug an dem Kanal ist und in einer ausreichenden Menge zugegen ist, um detektierbar mit einer Partnerverbindung zu wechselwirken, die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einer lichtemittierenden Verbindung und einem Dämpfungsmittel, die/das den Kanal passiert.

[0337] Ein "Wandmaterial" wie hier verwendet ist eine feste oder halb feste Barriere jeglicher Abmessungen, die in der Lage ist, mindestens einen Kanal zu tragen. Ein halbfestes Material ist ein selbsttragendes Material und kann zum Beispiel ein Gelmaterial wie ein Polyacrylamidgel sein. Zum Beispiel kann das Wandmaterial

aus einem einzigen Stützmaterial aufgebaut sein, das leitend oder nichtleitend, lichtdurchlässig oder lichtundurchlässig, durchsichtig oder undurchsichtig sein kann. In einigen Fällen kann das Mittel in dem Wandmaterial eingebettet sein. In diesen Fällen kann das Wandmaterial vollständig oder teilweise aus einem nichtleitenden Schicht, einer lichtdurchlässigen Schicht oder einer durchsichtigen Schicht hergestellt sein, um es zu ermöglichen, daß das Mittel dem in dem Wandmaterial gebildeten Kanal ausgesetzt ist, um die Signalerzeugung zu ermöglichen. Wenn das Wandmaterial nur teilweise aus diesen Materialien besteht, kann das verbliebene Wandmaterial aus einer leitenden, lichtundurchlässigen oder undurchsichtigen Schicht bestehen, die die Signalerzeugung verhindert. In einigen Fällen besteht das Wandmaterial aus Schichten verschiedener Materialien. Zum Beispiel kann das Wandmaterial aus einer einzigen leitenden Schicht und einer einzigen nichtleitenden Schicht bestehen. Alternativ kann das Wandmaterial aus einer einzigen nichtleitenden Schicht, umgeben von zwei leitenden Schichten, bestehen. Mehrere Schichten und verschiedene Kombinationen von Materialien werden von dem erfindungsgemäßen Wandmaterial umfaßt.

[0338] Wie hier verwendet ist eine "Schicht aus lumineszierendem Film" ein Film, der natürlicherweise luminesziert oder lumineszierend gemacht ist durch einige Mittel der Anregung oder Beleuchtung, z. B. elektrooptische dünne Filme und Filme mit hohem Brechungsindex, die durch interne Reflexion beleuchtet werden.

[0339] Ein "leitendes Material" wie hier verwendet ist ein Material, das zumindest leitfähig genug ist, um einen Energietransfer zwischen einem Donor und einem Akzeptor zu verhindern.

[0340] Ein "nichtleitendes Material" wie hier verwendet ist ein Material, das weniger als jene Menge leitet, die einen Energietransfer zwischen einem Donor und einem Akzeptor ermöglichen würde.

[0341] Ein "lichtdurchlässiges Material" wie hier verwendet ist ein Material, das durchlässig ist für Licht einer Wellenlänge, die durch die eingesetzte spezifische elektromagnetische Strahlung, Dämpfungsquelle oder die Fluoreszenzanregungsquelle hervorgerufen wird.

[0342] Ein "lichtundurchlässiges Material" wie hier verwendet ist ein Material, das undurchlässig ist für Licht einer Wellenlänge, die durch die eingesetzte spezifische elektromagnetische Strahlung, Dämpfungsquelle oder die Fluoreszenzanregungsquelle hervorgerufen wird.

[0343] Ein "Kanal" wie hier verwendet ist ein Durchgang durch ein Medium, den ein Polymer passieren kann. Der Kanal kann jegliche Abmessungen aufweisen, solange das Polymer in der Lage ist, ihn zu passieren. Zum Beispiel kann der Kanal ein unverzweigter gerader zylindrischer Kanal sein oder er kann ein verzweigtes Netzwerk von miteinander verbundenen gewundenen Kanälen sein. Vorzugsweise ist der Kanal ein gerader Nanokanal oder ein Mikrokanal. Ein "Nanokanal" wie hier verwendet ist ein Kanal mit Abmessungen in der Größenordnung von Nanometern. Der durchschnittliche Durchmesser eines Nanokanals liegt zwischen 1 nm und 999 nm. Ein "Mikrokanal" wie hier verwendet ist ein Kanal mit Abmessungen in der Größenordnung von Mikrometern. Der durchschnittliche Durchmesser eines Mikrokanals liegt zwischen 1 µm und 1 mm. Bevorzugte Spezifikationen und Abmessungen von Kanälen, die nach der Erfindung geeignet sind, werden unten ausführlich erläutert. In bevorzugten Ausführungsformen ist der Kanal in der Wand fixiert.

[0344] Ein Mittel ist an dem Wandmaterial in einer Weise befestigt, daß es detektierbar mit einer Partnerverbindung wechselwirkt, indem es einen Energietransfer oder eine Dämpfung mit der lichtemittierenden Partnerverbindung, die den Kanal des Wandmaterials passiert, durchmacht. Um mit der Partnerverbindung zu wechselwirken, kann das Mittel in unmittelbarer Nähe zu dem Kanal angeordnet sein. Zum Beispiel kann das Mittel an der Innenseite des Kanals befestigt sein, an der äußeren Oberfläche des Wandmaterials befestigt sein, in einem konzentrierten Bereich der externen Oberfläche des Wandmaterials, die den Rand des Kanals umgibt, befestigt sein, in das Wandmaterial eingebettet oder in Form eines konzentrischen Rings in das Wandmaterial, das den Kanal umgibt, eingebettet sein. Wahlweise kann das Mittel die gesamte Oberfläche des Wandmaterials bedecken oder kann in dem gesamten Wandmaterial eingebettet sein. Um die Signalerzeugung zu verbessern, wenn das Mittel nicht lokalisiert ist, kann eine Maske verwendet werden, die einige Flächen des Wandmaterials abdeckt, so daß nur lokale Bereiche des Mittels exponiert sind. Eine "Maske" wie hier verwendet ist ein Objekt, das Öffnungen jeder Größe oder Gestalt aufweist. Mehr als ein Mittel kann an dem Wandmaterial befestigt sein, um verschiedene Signale zu erzeugen, wenn die Mittel dem Partnermittel gegenüber ausgesetzt werden.

[0345] Das Mittel kann durch jedes Mittel an der Oberfläche des Wandmaterials befestigt sein, das zur Herstellung von Befestigungen in der Fachwelt bekannt ist. Beispiele für Verfahren zur Konjugation conjugation von Biomaterialien sind in Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, Inc., San Diego,

1996, dargestellt.

[0346] Wenn das Mittel an der Oberfläche des Wandmaterials befestigt ist, kann es direkt an dem Wandmaterial befestigt sein oder es kann über einen Linker angebracht sein. Ein "Linker" wie hier in bezug auf die Befestigung des Mittels verwendet ist ein Molekül, das eine lichtemittierende Verbindung oder eine Dämpfungsverbindung an das Wandmaterial angebunden. Linker sind in der Fachwelt gut bekannt. Üblicherweise verwendete Linker beinhalten Alkane verschiedener Längen.

[0347] Das Mittel wird an dem Wandmaterial in einer Menge befestigt, die ausreicht, um mit einer lichtemittierenden Partnerverbindung detektierbar zu wechselwirken. Eine "lichtemittierende Partnerverbindung" wie hier verwendet ist eine lichtemittierende Verbindung wie oben definiert, die jedoch spezifisch mit dem Mittel wechselwirkt und einen Energietransfer oder eine Dämpfung bei Anordnung in unmittelbarer Nähe zu dem Mittel durchmacht. Die Menge der lichtemittierenden Partnerverbindung und die erforderliche Menge des Mittels hängen von der Art des verwendeten Mittels und der lichtemittierenden Verbindung ab.

[0348] Ein anderes Beispiel für einen Herstellungsartikel ist ein Wandmaterial, das eine eine Mehrzahl von Kanälen bildende Oberfläche sowie eine in einem diskreten Bereich des Wandmaterials benachbart zu mindestens einem der Kanäle angeordnete Station aufweist, wobei die Station sich nahe genug an dem Kanal befindet und in einer Menge vorhanden ist, die ausreicht, um ein Signal zu erzeugen, das aus einer detektierbaren physikalischen Änderung in einem den Kanal passierenden Polymer aus verbundenen Einheiten oder in der Station hervorgerufen wird, wenn das Polymer der Station gegenüber ausgesetzt wird. Ein zu mindestens einem der Kanäle des Wandmaterials benachbarter "diskreter Bereich" ist ein lokaler Bereich, der umgeben ist von Wandmaterial, das keine Station aufweist. Der Bereich, der den diskreten Bereich umgibt, wechselwirkt nicht mit der Einheit, um dasselbe charakteristische Signal zu erzeugen, das durch Wechselwirkung der Einheit mit der Station gebildet wurde. Der diskrete Bereich ist in oder in der Nähe des Kanals angeordnet, so daß die Station an dem diskreten Bereich der Einheit ausgesetzt wird, wenn diese den Kanal durchquert.

[0349] Ein weiterer Herstellungsartikel ist ein Wandmaterial mit einer einen Kanal bildenden Oberfläche und einer Mehrzahl von Stationen, die alle an einem diskreten Bereich des Wandmaterials in der Nähe des Kanals befestigt sind, wobei die Stationen sich nahe genug an dem Kanal befinden und in einer Menge zugegen sind, die ausreicht, um ein Signal zu erzeugen, das aus einer physikalischen Änderung in einem den Kanal durchquerenden Polymer aus verbundenen Einheiten oder in der Station hervorgerufen wird, wenn das Polymer der Station ausgesetzt wird.

[0350] Eine "Mehrzahl von Stationen" wie hier verwendet wird durch mindestens zwei Stationen gebildet. Bevorzugt ist eine Mehrzahl von Stationen mindestens drei Stationen. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist die Mehrzahl von Stationen mindestens fünf Stationen.

[0351] Bevorzugt ist der Herstellungsartikel eine Nanokanalplatte. Die folgende Beschreibung einer optimalen Ausgestaltung einer Nanokanalplatte, die Fluorophore innerhalb der Platte eingebettet aufweist, wird nur zu Veranschaulichungszwecken bereitgestellt. Das Beispiel beschreibt Verfahren zur Optimierung mehrerer Aspekte des Herstellungsartikels. Die Beschreibung ist in keiner Weise beschränkend für den hier beanspruchten Herstellungsartikel.

[0352] Mehrere Beispiele für Nanokanäle sind in **Fig. 4** dargestellt. **Fig. 4A** zeigt eine Nanokanalplatte **60** mit Schichten aus leitendem Material **62** und nichtleitendem Material **64**. Der Kanal **70** weist einen Durchmesser auf, der ausreicht, um die Passage einer doppelsträngigen markierten DNA in einer linearen Weise zu gestatten. Bei diesem Beispiel sind Donor-Fluorophore **68** in dem durchsichtigen nichtleitenden Material in einem konzentrischen Ring um jeden Kanal eingebettet. Der verbleibende Teil der Nanokanalplatte besteht aus lichtundurchlässigem Material **66**.

[0353] Die **Fig. 4B, C, D, E** und **K** zeigen eine Nanokanalplatte mit Fluorophoren **68**, die an der Oberfläche des Wandmaterials angebracht sind, das die durch den Kanal **70** gebildeten Öffnungen umgibt. Wie in den **Fig. 4B** und **4D** dargestellt, können die Fluorophore die gesamte Oberfläche des Wandmaterials bedecken. Wie in den **Fig. 4C, E** und **K** dargestellt, können die Fluorophore aber auch um die Kanalöffnung konzentriert sein, statt die ganze Oberfläche zu bedecken. Darüber hinaus kann das die Fluorophore tragende Wandmaterial eine leitende Schicht **62** sein, wie sie in den **Fig. 4D** und **E** dargestellt ist, das Wandmaterial kann eine Stützschiicht **72** sein wie in den **Fig. 4B** und **C** dargestellt. Eine Stützschiicht kann jede Art Material sein, einschließlich, aber nicht beschränkt auf leitendes, nichtleitendes, durchsichtiges, lichtdurchlässiges und lichtundurchlässiges.

[0354] Die **Fig. 4F, G, H, I und L** zeigen eine Nanokanalplatte mit Fluorophoren **68**, die in das den Kanal **70** umgebende Wandmaterial eingebettet sind. Erneut können die Fluorophore über die ganze Fläche ausgebreitet sein (in **Fig. 4F** dargestellt) oder können und den Kanal konzentriert sein, wie in den **Fig. 4G, H und I** dargestellt: Bei den in den **Fig. 4F, G, H, I und L** gezeigten Ausführungsformen sind die Fluorophore eingebettet in eine Schicht aus nichtleitendem Material **62** oder aus einem durchsichtigen Material **74** oder aus einem lichtdurchlässigen Material **79**. Die Schicht mit den darin eingebetteten Fluorophoren kann die Oberfläche des Wandmaterials bilden wie in den **Fig. 4F und G** dargestellt oder kann sandwichartig zwischen anderen Schichten angeordnet sein. Zum Beispiel ist die nichtleitende Schicht **64** in den **Fig. 4H und I** sandwichartig zwischen zwei leitenden Schichten **62** angeordnet. Die lichtdurchlässige Schicht **79** in **Fig. 4L** ist sandwichartig zwischen zwei lichtundurchlässigen Schichten **78** angeordnet. In einigen Fällen bilden die gezeigten Schichten das gesamte Wandmaterial. In anderen Fällen können die Schichten an Stützsichten angrenzen oder sandwichartig zwischen diesen angeordnet sein, wie in **Fig. 4I** gezeigt.

[0355] **Fig. 4J** zeigt eine Nanokanalplatte mit Fluorophoren **68**, die an der Oberfläche des Wandmaterials angebracht sind, das die durch die Kanäle **70** gebildeten Öffnungen umgibt. Das Material, das alle exponierten Oberflächen des Wandmaterials, einschließlich der Oberfläche innerhalb des Kanals, umgibt, ist ein leitendes Material.

[0356] Die **Fig. 4M und N** zeigen eine Nanokanalplatte mit einem dünnen lumineszierenden Film **76**, der zwischen dem Wandmaterial, das mindestens einen Teil des Kanals **70** umgibt, angeordnet ist. Der dünne lumineszierende Film bildet entweder die Oberfläche des Wandmaterials und befindet sich zu einer lichtundurchlässigen Schicht **78** benachbart wie in **Fig. 4M** gezeigt, oder kann zwischen zwei lichtundurchlässigen Schichten **78** angeordnet sein, wie in **Fig. 4N** dargestellt.

[0357] Die **Fig. 4O und P** zeigen eine Nanokanalplatte mit zwei Schichten von Fluorophoren **68**, die entweder in das Wandmaterial eingebettet sind oder an der Oberfläche des Wandmaterials angebracht sind. In **Fig. 4O** sind die Fluorophorschichten **68** an der Oberfläche eines leitenden Materials **62** auf beiden Seiten des Wandmaterials angebracht und umgeben die durch den Kanal gebildeten Öffnungen. In **Fig. 4P** sind die Fluorophorschichten **68** eingebettet in zwei lichtdurchlässige Schichten **79**, die die lichtundurchlässige Schicht **78** sandwichartig umgeben.

[0358] Ein bevorzugtes erfindungsgemäßes Verfahren beinhaltet die Analyse von radiomarkierten Polymeren wie oben beschrieben. Die Herstellung von radiomarkierten Polymeren wie beispielsweise DNA (zum Beispiel mit ^{32}P oder ^3H) ist in der Fachwelt bekannt. Die folgende Beschreibung repräsentiert eine von vielen möglichen Ausführungsformen zur Analyse von radiomarkierten Polymeren nach den erfindungsgemäßen Verfahren (**Fig. 4Q und R**). Ein radiomarkiertes Nukleinsäuremolekül **160** wird mit einem einzigen hergestellten mehrschichtigen Nanokanal **162** analysiert. Der Nanokanal weist den Durchmesser des markierten Nukleinsäuremoleküls auf und ist so konstruiert, daß er einen definierten Detektionsbereich erhält. Die in den **Fig. 4Q und R** beispielhaft dargestellten Nanokanalplatten sind eine heterogene mehrschichtige Struktur, die aus zwei strahlungsundurchlässigen Schichten wie beispielsweise Blei und Lucite-Filmen **164, 166** und einem Film aus einem Material mit geringerer Dichte (oder einer Szintillationsschicht) **168** (z. B. konventionellen Polymeren, Polymethylmethacrylat, Polystyrol, Teflon etc.) besteht. Die Bleifilme in **Fig. 4Q** umgeben die Schicht aus Material geringerer Dichte sandwichartig und sind von einer solchen Dicke, daß sie den Durchtritt von Strahlung verhindern. Das Material geringerer Dichte erlaubt den Durchtritt von Strahlung, wodurch es einen definierten Bereich zur Strahlungsdetektion erzeugt. Wenn die radiomarkierte DNA den definierten Detektionsbereich passiert, wird Kernstrahlung emittiert, von der einiges durch den definierten Bereich der Strahlungsdetektion hindurchtritt. **Fig. 4R** zeigt eine Nanokanalplatte mit Material geringerer Dichte **168**, das die durch den Kanal gebildete Öffnung umgibt. Das alle exponierten Oberflächen des Wandmaterials einschließlich der Oberflächen innerhalb des Kanals umgebende Material ist eine strahlungsundurchlässige Schicht **165**.

[0359] In einer verwandten Ausführungsform zur Analyse von radiomarkierten Nukleotiden (**Fig. 5**) wird ein Detektionssystem auf Basis von Szintillationszählung und mehreren Nanokanälen bereitgestellt. Eine Nanokanalordnung **170** wird wie in **Fig. 5** dargestellt hergestellt. Mehrere mehrschichtige Kanäle **172** sind vorgesehen zur parallelen Verstärkung der Datenausgabe. Jeder einzelne Kanal besteht aus zwei Kernstrahlung abschirmenden Schichten **174**, die Kernstrahlung abschirmen, und einer Szintillationsschicht **176**, die bei Exposition gegenüber Kernstrahlung zur Fluoreszenz angeregt wird. Die einzelnen Kanäle sind durch ein Kernstrahlung abschirmendes Material voneinander getrennt. Die Kernstrahlung wird durch Übersichtung mit Lucite von optischer Qualität (oder jedem anderen transparenten Material, das den Durchtritt von Kernstrahlung verhindert) daran gehindert, das Fluoreszenzdetektionssystem zu erreichen. Dies ermöglicht es, daß nur das Fluoreszenzsignal das Detektionssystem erreicht.

[0360] Jeder der oben beschriebenen Nanokanäle ist nur ein Beispiel. Es wird daher vorweggenommen, daß jede der Einschränkungen, die in bezug auf diese Ausführungsformen beschrieben sind, die irgendein Element oder eine Kombination von Elementen beinhalten, bei jedem Nanokanal vorgesehen sein kann. Die Herstellung von Filmen mit mehreren Schichten unterschiedlichen Materials ist im Stand der Technik beschrieben, z. B. US-Patent Nr. 5,462,467, Ferreira et. al., Thin Solid Films 244: 806–809 (1994).

[0361] In dem Beispiel sind bereitgestellte Donor-Fluorophore in einem konzentrischen Ring um jeden Kanal konzentriert, um die Donorintensität zu optimieren. Ein konzentrischer Ring wird bevorzugt, weil der Bereich des Energietransfers teilweise durch eine radiale Förster-Distanz limitiert ist. Die Untersuchung eines Kanals im Detail wird die bedeutende Änderung in den Donorintensitäten veranschaulichen, die bei der Konfiguration mit konzentrischem Ring auftreten kann. **Fig. 6** zeigt einen einzelnen Kanal **82**, der die Konfiguration mit konzentrischem Ring aufweist. Der äußerste konzentrische Ring **86** markiert den Rand der Donorfluorophore, die um den Kanal angeordnet sind. Der mittlere konzentrische Ring **84** bezeichnet den Bereich, wo die Rate des Energietransfers von dem Donor zu dem Akzeptor größer ist als die Emissionsrate der Donorfluorophore.

[0362] Das Grundprinzip bei der Einbettung der Donorfluorophore in ein festes Medium wird am besten verstanden, wenn man die Mechanismen der Photobleichung und Dämpfung untersucht. Die Faktoren, die ein Fluoreszenzsignal vermindern, beinhalten: Photobleichung, Temperaturdämpfung, Energietransferdämpfung, Kollisionsdämpfung, Reaktionen im angeregten Zustand und Lösungsmittelleffekte. Diese Mechanismen sind sich darin ähnlich, daß sie alle bei Kollisions- oder bimolekularen Ereignissen entstehen. Ein festes Medium ist eine physikalische Barriere für die unerwünschten molekularen Prozesse und ist ein Mittel zur Isolierung der Donorfluorophore. Der Mechanismus der Photobleichung ist zum Beispiel auf eine Reaktion zwischen einem angeregten Fluorophor und Sauerstoff unter Bildung eines nichtfluoreszierenden Produktes zurückzuführen (Menter et al., 1978; Menter et al. 1979; Giloh und Sedat, 1982). Ein festes Medium, insbesondere eines, das in einer sauerstofffreien Umgebung hergestellt ist, hindert den Sauerstoff daran, das eingebettete Fluorophor zu erreichen, wodurch mögliche oxidative Reaktionen ausgeschaltet werden (Garland und Moore, 1979; Rost, 1990). Um die Wirkung eines festen Mediums noch besser zu verstehen wird eine kurze Zusammenfassung zu den anderen Dämpfungseffekten präsentiert. Temperaturdämpfung ist eine Abnahme in der Fluoreszenz bei zunehmender Temperatur. Der Grad der Temperaturabhängigkeit hängt von der Verbindung ab; er beträgt üblicherweise etwa 1% Änderung in der Dämpfung pro Grad Celsius (Guilbault, 1973). Es wird angenommen, daß der Effekt auf die verstärkte Molekülbewegung und die erhöhte Häufigkeit von Kollisionen zurückzuführen ist, was zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für den Übergang in den Grundzustand führt, bevor Fluoreszenz auftreten kann. Kollisionsdämpfung ist eine weite Kategorie, die aus vielen möglichen Mechanismen besteht, die einen direkten Kontakt zwischen einem Fluorophor und einem anderen Molekül beinhalten (Lakowicz, 1983). Anregungszustandsreaktionen beinhalten den reaktiven angeregten Zustand eines Fluorophors in einer Reaktion mit in der Nähe befindlichen Lösungsmittelmolekülen und bildet eine Untergruppe der Kollisionsdämpfung (Porter, 1967; Zweig, 1973). Lösungsmittelleffekte bestehen aus Lösungsmittel-Fluorophor-Kollisionen und -Wechselwirkungen, einschließlich Effekten der Wasserstoffbrückenbindung, Säure-Base-Chemie und von Ladungstransfer-Wechselwirkungen (Lakowicz, 1983). Energietransferdämpfung ist auf die Wirkungen von Verunreinigungen auf Fluorophoren über unerwünschten FRET zurückzuführen. Aus dieser kurzen Auflistung von Photobleichungs- und Dämpfungsmechanismen wird deutlich, daß molekulare Wechselwirkungen mit Fluorophoren die Hauptursachen für verminderte Fluorophoremmissionen sind. Ein festes Medium eliminiert daher diese unerwünschten molekularen Wechselwirkungen, Kollisionen und Reaktionen durch Isolieren der Fluorophore und Errichten einer physikalischen Barriere, die den Eintritt von unerwünschten Dämpfungsmolekülen verhindert.

[0363] Die Gleichung, die den Energietransfer beschreibt, sollte untersucht werden, um die Wirkung eines festen Mediums auf den Energietransfer zu bestimmen. Die zu berücksichtigende Gleichung beschreibt die Förster-Distanz (Selvin, 1995; Cantor und Schimmel, 1980; Wu und Brand, 1994; Clegg et al., 1995; Fairclough und Cantor, 1978):

$$R_0 = \frac{\sqrt[6]{8,79 \times 10^{-5} J \Phi_D K^2}}{n^4}$$

[0364] J ist die normalisierte spektrale Überlappung zwischen der Donor- und der Akzeptorabsorption, Φ_D ist die Quanteneffizienz (oder Quantenausbeute) für die Donoremission in Abwesenheit des Akzeptors (Φ_D ist die Zahl der emittierten Photonen geteilt durch die Zahl der absorbierten Photonen), n ist der Brechungsindex und K^2 ist der geometrische Faktor, der mit dem relativen Winkel der zwei Übergangsdipole in Beziehung steht. Die Einbettung des Donor-Fluorophors in ein festes Medium erhöht n , den Brechungsindex. In Lösungsmittelsystemen wird n als etwa 1,35 angenommen (Selvin, 1995), leicht höher als der Wert für Wasser (1,33). Einige

typische Werte für feste Medien sind 1,46 für Quarzglas, 1,52 für Kronglas und 1,66 für dichtes Flintglas. Ein Verhältnis der R_0 s für ein festes Medium und ein Lösungsmittelsystem kann verwendet werden, um die Größenordnung der Wirkung einer Änderung des Brechungsindex zu bestimmen:

$$\frac{R_0}{R_0} = \left(\frac{n}{n'}\right)^2$$

wobei die mit Strichindex versehenen Werte diejenigen für das feste Medium und die nicht mit Strichindex versehenen Werte diejenigen für ein Lösungsmittelsystem sind. Angenommen, $n' = 1,5$, dann wird das Verhältnis 0,93. Die Försterdistanz verändert sich daher nur um 7%, ein Wert, der leicht eine Korrektur vorgesehen werden kann durch Verwendung von Donor-Akzeptor-Paaren, die ein höheres ursprüngliches R_0 aufweisen.

[0365] Unter erneuter Bezugnahme auf **Fig. 6**, konzeptionell, ohne Präsentation von Gleichungen, nimmt die Rate des Energietransfers (k_{Transfer}) vom Zentrum des Kanals mit zunehmender Distanz vom Zentrum ab (**Fig. 6**). Es ist auch bekannt, daß die Rate der Donoremission (k_{emit}) über den vollständigen Bereich der Donorfluorophore in Abwesenheit von Akzeptoren einheitlich ist (**Fig. 6**). Der dem Kanal, und somit dem Akzeptor, nächstliegende Bereich wird vollständig gedämpft. In allen Bereichen mit weniger als R_{gleich} , wird der Donor-Fluorophor vollständig gedämpft, weil k_{Transfer} größer ist als k_{emit} . In Bereichen größer als R_{gleich} ist die Rate der Donor-Emission größer als die Rate des Energietransfers, so daß die Dämpfung unvollständig ist.

[0366] Wenn der konzentrische Ring von Donor-Fluorophoren einen Radius gleich R_{gleich} aufweist, kann eine hundertprozentige Intensitätsänderung für das Donor-Fluorophor auftreten. Dies bedeutet, daß beim Austritt eines akzeptormarkierten Nukleotids aus dem Kanal der Akzeptor mit perfekter Effizienz detektiert wird. Berücksichtigt man, daß die Vertrauensintervalle mit dem SRV des Systems in Beziehung stehen, wird das minimale Signal-Rausch-Verhältnis, das benötigt wird, um ein 99,9% Vertrauensintervall zu erzeugen, für eine solche Änderung zu 6 : 1 berechnet. Die SRVs für die vorgeschlagenen Detektionssysteme sind größer als 600 : 1.

[0367] Eine quantitative Erklärung wird an dieser Stelle präsentiert, um R_{gleich} zu berechnen. Die Gleichungen für die Rate der Donor-Emission und den Energietransfer werden dargestellt. Die Rate der Donor-Emission (k_{emit}) ist wie folgt:

$$k_{\text{emit}} = \frac{I \xi \rho N}{h \nu}$$

wobei I die Intensität des auf die Donor-Fluorophore einfallenden Lichtes ist, ξ der molare Extinktionskoeffizient des Donor-Fluorophors ist, ρ für Fluoreszenzemission konstant ist ($3,8 \times 10^{-21}$ mol cm^3/L). N ist die Zahl der Donor-Fluorophore, h ist die Plancksche Konstante ($6,6261 \times 10^{-34}$ J s), und ν die Frequenz des anregenden Lichts ist.

[0368] Die Rate des Energietransfers (k_{Transfer}) von vielen Donoren zu einem Akzeptor wird abgeleitet aus der ursprünglichen Försterratengleichung (Förster, 1965) für einen Donor und einen Akzeptor. Die ursprüngliche Gleichung ist gegeben als:

$$k = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r}\right)^6$$

wobei k die Rate des Energietransfers von einem Donor zu einem Akzeptor ist, R_0 die Förster-Distanz ist, τ die Fluoreszenz-Lebensdauer des Donors ist und r die Distanz vom Donor zum Akzeptor ist. Die Ableitung eines Multidonorsystems ist unkompliziert und folgt aus der Beschreibung des oben beschriebenen Multidonorsystems.

[0369] Es gibt zwei Beschränkungen in der Menge übertragener Energie für ein Multidonorsystem. Erstens ist da das Sättigungslimit, das durch die Lebensdauer des Akzeptors gesetzt wird. Der Akzeptor kann immer nur dann angeregt werden, wenn er sich im Grund-Singulett-Zustand befindet. Für einen Akzeptor mit einer Lebensdauer von 1 ns liegt das obere Limit bei 1×10^9 Anregungsereignissen/Sekunde. Dieses hohe Sättigungsniveau ist bei Berücksichtigung der geringen Anregungsrate für ein einzelnes Fluorophor (25000 Anregungsereignisse/Sekunde) kaum ein Grund zur Besorgnis. Die zweite Beschränkung besteht in der Wahrscheinlichkeit der gleichzeitigen Abregung von Donor-Fluorophoren. Wie oben berechnet, kann nur eine geringe Zahl von Anregungsereignissen von Donor-Fluorophoren auftreten. Da der Akzeptor nicht mit Anregungsereignissen gesättigt ist, die von Anregungsereignissen herrühren und die Wahrscheinlichkeit der gleichzeiti-

gen Donor-Abregung gering ist, ist die Rate des Energietransfers für ein Multidonorsystem direkt proportional zur Zahl der Donor-Fluorophore (N):

$$k_{\text{Transfer}} = \frac{N}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

[0370] Mit dieser Gleichung ergibt sich der Radius, bei dem k_{Transfer} kemit entspricht (R_{gleich}) durch Gleichsetzung der zwei Geschwindigkeitsgleichungen und Auflösung nach r.

$$k_{\text{emit}} = k_{\text{Transfer}} = \frac{I \xi \rho N}{h\nu} k = \frac{N}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

[0371] Auflösung nach r.

$$r = R_{\text{gleich}} = \frac{R_0}{\sqrt[6]{\tau_D I \xi \rho / h\nu}}$$

[0372] Ein numerischer Wert für R_{gleich} kann berechnet werden. Tabelle 3 gibt die Werte für die Variablen und den Grund für die Wahl des gewählten Wertes an.

Tabelle 3		
Variable	Wert	Grund
R_0	60 Å	Bereich für den Förster-transfer ist 20 Å - 100 Å
τ_D	1×10^{-9} s/Photon	Fluoreszenzlebensdauern liegen im Bereich von 1 ns - 20 ns
h	$6,6261 \times 10^{-34}$ J s	Plancksche Konstante
ν	$6,1224 \times 10^{14}$ x s^{-1}	$c=\lambda\nu$; $\lambda=490$ nm (Anregung von
		Fluoreszein)
I	30 W/cm ²	Die Intensität von 2W-Lasern ist gegeben durch P/A. A = Strahlbereich (r=2mm), Intensität des Lasers beträgt 64 W/cm ²
ϵ	91.0001/M cm	Molarer Extinktionskoeffizient für Fluoreszein
ρ	$3,8 \times 10^{-21}$ M cm ³	Konstante für die Fluoreszenzemission von Fluoreszein
R_{gleich}	350 Å	Aus der obigen Gleichung

[0373] R_{gleich} wird zu 350 Å berechnet, was innerhalb einer Größenordnung der Förster-Distanz liegt. Dies bedeutet, daß ein konzentrischer Fluorophor-Ring um den Kanal herum mit einem Radius von 350 Å bei Passage einer Akzeptormarkierung eine hundertprozentige Änderung in der Signalintensität ergeben wird. In der Praxis ist es sowohl aus dem Gesichtspunkt der Signaldetektion als auch des Erfordernisses der Auflösung benachbarter Basen unnötig, solch eine starke Donorintensitäts-Abnahme zu haben. Mit einem SRV von 600 : 1 ergibt eine Intensitätsänderung von 0,5% ein Vertrauensintervall von 99,9%. Die Auflösung benachbarter Basen ist möglich, wenn man auf weitere Abnahmen in der Donoremission schaut, wenn zwei Akzeptoren statt einem in der Donorschicht vorhanden sind. Wenn ein Akzeptor die Donoremission auf Null reduziert, wird ein zusätzlicher Akzeptor nicht detektiert werden, weil die Donoremission nicht weiter reduziert werden kann. Dieser Aspekt wird unten ausführlich diskutiert. Ein Beispiel für ein Verfahren zur Konstruktion eines konzentrischen Rings von Donor-Fluorophoren um jeden Kanal durch Verwendung von fotolabilen Schutzgruppen und Lichtbeugung wird unten ebenfalls dargestellt.

[0374] Nanokanäle, die einen Kanaldurchmesser von mindestens 1 nm haben, sind kommerziell in Form von Polycarbonatfiltern von Poretics Inc. erhältlich und können auf Bestellung von Corning Separations Inc. hergestellt werden. Es gibt mehrere Verfahren, die verwendet werden können, um Nanokanäle mit dem gewünschten Durchmesser zu erzeugen.

[0375] Ein Verfahren zur Herstellung von Nanokanalplatten besteht in einem Spurätz("Track-etch")-Verfahren, das zylindrische Poren mit einheitlichem Durchmesser in einem Membranmaterial erzeugt. Mikroporöse und nanoporöse Polymermembranen mit Porendurchmessern in der Größenordnung von 10 nm und mit Porendichten von annähernd 10^9 Poren pro Quadratcentimeter können durch das Spurätzverfahren hergestellt werden (R. L. Fleischer, P. B. Price, R. M. Walker, Nuclear Tracks in Solids (Univ. of California Press, Berkeley, CA (1975)). Die Herstellung von Poren mittels Spurätzung ist ein zweistufiger Prozess. Im ersten Schritt werden dünne Filme aus Polycarbonat (oder anderen polymeren Materialien) gegenüber kollimierten geladenen Partikeln in einem Kernreaktor ausgesetzt. Wenn diese Partikel durch das Polycarbonatmaterial treten, hinterlassen sie sensibilisierte Spuren. Die Dichte der Spuren wird kontrolliert durch Verändern der Zeitdauer, die sich der Film in dem Kernreaktor befindet. Im zweiten Schritt werden die von den Partikeln hinterlassenen Spuren vorzugsweise zu einheitlichen zylindrischen Kanälen geätzt oder aufgelöst. Die Durchmesser der Perforationen können durch die Aufenthaltszeit des Ätzmittels auf dem Film kontrolliert werden. Viele Beispiele für Verfahren zur Bildung von spurgeätzten Membranen sind im Stand der Technik beschrieben, z. B. die Europäische Patentanmeldung Nr. 83305268.1, Veröffentlichungsnummer 0109147, an Varian Associates Inc., U.S.-Patente Nr. 3,303,085; 3,662,178; 3,713,921; 3,802,972; 3,852,134, 4,956,219, 5,462,467, 5,564,959 und 5,449,917.

[0376] Die kommerziell erhältlichen Membranen sind im allgemeinen aus Polycarbonaten oder Polyestern hergestellt; auch andere Materialien sind dem Spurätzverfahren jedoch zugänglich (Id.). Andere polymere Materialien beinhalten beispielsweise, sind aber nicht beschränkt auf Polystyrole, aromatische Polyester, Polyolefine, einschließlich Polyethylen, Polyethylenterephthalat, Polypropylen, Vinylkunststoffe wie beispielsweise Polyvinylidifluorid (PVDF) und Zelluloseester wie beispielsweise Zellosennitrat, Zellulosebutyrat und Zelluloseacetat. Wenn die erfindungsgemäße Nanokanalplatte durch eine Spurätztechnik hergestellt ist, kann sie aus jedem Material gebildet sein, das für das Spurätzverfahren geeignet ist, zur Bildung der spurgeätzten Membran verwendet werden.

[0377] Vorrichtungen zur Durchführung des Materialbombardements mit hochenergetischen Partikeln sind in der Forschung und Industrie gut bekannt. Die Partikel, die zur Bildung der Spuren verwendet werden, können durch einen Beschleuniger für geladene Teilchen, wie beispielsweise einen elektrostatischen Beschleuniger (z. B. Van-de-Graaff-Beschleuniger oder Tandembeschleuniger), einen Linearbeschleuniger oder einen Kreisbeschleuniger wie einem Zyklotron oder einem anderen im Stand der Technik bekannten Mittel erzeugt werden.

[0378] Sobald der beschädigten damaged Spuren in dem Film gebildet sind, werden die Kanäle oder Poren durch selektives Ätzen des Films mit einem Gas oder einer Flüssigkeit gebildet. Die Verweildauer des Ätzmittels bestimmt die Größe des Kanals. Der spurgeätzte Film wird dem Ätzmittel gegenüber für eine ausreichende Zeit ausgesetzt, um Kanäle zu bilden, die so bemessen sind, daß sie für die gewünschte Anwendung geeignet sind, was von der Art des analysierten Polymers und der Art der Analyse abhängt. Der Kanaldurchmesser kann durch Verwendung eines Rasterelektronenmikroskops (SEM) gemäß den in Basic Principles of Membrane Technology, M. Mulder, Klumer Academic, 1991, beschriebenen Verfahren gemessen werden.

[0379] Ein zweites Verfahren zur Herstellung von Nanokanälen definierten Durchmesseres besteht darin, eine Kombination aus Spurätzung und Oberflächenbeschichtung zu verwenden. Eine Polycarbonatmembran mit einem Durchmesser, der größer als die gewünschte Nanokanalvorrichtung ist, wird mit einem dünnen Film eines Materials mit einer definierten Dicke beschichtet. Die erhaltene Struktur ist eine Polycarbonatmembranoberfläche, die bis zu dem gewünschten Durchmesser beschichtet ist. Die erste Schicht von dünnem Film, die auf die Nanokanalplatte aufgebracht wird, ist eine leitende Schicht. Eine leitende Schicht erleichtert die Auflösung von benachbarten Basen (was unten ausführlicher beschrieben wird).

[0380] Dünne Schichten aus leitenden Polymeren werden durch Lösungsmittelabscheidung auf die Polycarbonatmembran aufgebracht. Lösungsmittelabscheidung von leitenden Polymeren ist beschrieben worden (Cheung et al., 1994; Ferreira et al., 1994; Ferreira und Rubner, 1995; Fou und Rubner, 1995). Der folgende Auszug stammt aus Fou und Rubner, 1995:

[0381] Wir beschreiben die Lösungsschemie und Verfahren, die benötigt werden, um die beschriebene

Schicht-für-Schicht-Verfahrenstechnik zu verwenden ... um leitende Polymere wie Polystyrol und Polyanilin zu mehrschichtigen Dünnschichten zu formen, mit Kontrolle sowohl über die Filmdicke als auch die Filmarchitektur auf Angströmebene. Ultradünne Filme mit Leitfähigkeiten von über 300 S/cm können hergestellt werden. Das Verfahren beinhaltet die spontane Adsorption von Monoschichten elektrisch leitfähiger Polymere auf Substraten aus verdünnten Lösungen. Anschließend werden mehrschichtige dünne Filme durch alternierende Abscheidung mit löslichen Polyanionen hergestellt. Die Dicke der dünnen Filme kann präzise auf Angströmebene kontrolliert werden und kann im Bereich von 5 Å und mehr als 1000 Å liegen. Die verwendeten leitenden Polymere sind Polypyrrol und Polyanilin, weil diese für ultradünne Schichten (~50 Å) extrem leitfähig (300 S/cm) gemacht werden können.

[0382] Der Vorteil bei der Verwendung eines Lösungsmittelabscheidungsverfahrens zur Erzeugung der gewünschten Nanokanäle ist zweifach. Erstens können Nanokanäle jedes beliebigen Durchmessers präzise und genau hergestellt werden. Zweitens, da die erste Schicht der Nanokanalplatte eine Leitungsschicht ist, ist es nur zweckmäßig, sie hinzuzufügen. Ein weiterer Vorteil, wenn auch kein wesentlicher, ist, daß die Zufügung einer dicken Schicht von leitendem Material den Höhepunkt-zu-Tal-Abstand der Polycarbonatoberfläche vermindert, wodurch eine einheitlichere Oberfläche erzeugt wird.

[0383] Ein anderes Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäßen Nanokanalvorrichtungen besteht in der Herstellung von Feldern arrays von Kohlenstoff-Nanoröhren. Iijima zeigte die Herstellung mehrerer konzentrischer zylindrischer Schalen hexagonal gebundener Kohlenstoffatome, die als katalytische Oberflächen dienen, um Spezies in einem eindimensionalen Raum einzugrenzen. Iijima, *Nature*, 354: 56 (1991), siehe auch U.S.-Patent Nr. 4,424,054.

[0384] Li, W. Z., et. al. haben ebenfalls ein Verfahren beschrieben zur Herstellung großer Flächen von hochgeordneten isolierten langen Kohlenstoff-Nanoröhren beschrieben. Das Verfahren beruht auf einer chemischen Dampfphasenabscheidung, die in den Poren eingebettete mesoporöses Silica enthaltende Eisen-Nanopartikel statt mit Übergangsmetall-Nanopartikeln bedecktes Kohlenstoff und Graphit oder Silica einsetzt. Das folgende Verfahren ist in Li, W. Z. et al. offenbart:

[0385] Mesoporöses Silica enthaltende Eisen-Nanopartikel wurden durch eine Sol-Gel-Verfahren durch Tetraethoxysilan (TEOS)-Hydrolyse in wäßriger Eisennitratlösung hergestellt. Analysenreines TEOS (10 ml) wurde mit 10,4 ml analytisch reinem Alkohol und 0,1 M wäßriger Eisennitratlösung (11,4 ml) durch Magnetühren für ~30 min gemischt. Einige Tropfen konzentrierten Fluorwasserstoff (0,2 ml) wurden dann zugegeben und die Mischung wurde für 15 min gerührt. Nach Gelbildung der Mischung wurde das Gel für 1 Woche bei 60°C getrocknet, um überschüssiges Wasser und andere Lösungsmittel zu entfernen. Das Gel wurde dann 10 Stunden bei 450°C bei 10^{-2} Torr kalziniert. Ein Silica-Netzwerk mit relativ einheitlichen Poren mit in den Poren eingebetteten Eisenoxid-Nanopartikeln wurde erhalten. Die Eisenoxid-Nanopartikel wurden dann bei 550°C in 180 Torr fließendem 9% H_2/N_2 ($110 \text{ cm}^3/\text{min}$) für 5 Stunden reduziert, um Eisen-Nanopartikel zu erhalten, die eine hohe katalytische Aktivität aufweisen. Anschließend wurde eine Mischung von 9% Acetylen in Stickstoff bei einer Flußrate von $110 \text{ cm}^3/\text{min}$ in die Kammer eingeleitet und Kohlenstoff-Nanoröhren wurden auf dem Substrat durch Abscheidung von aus dem Abbau von Acetylen bei 700°C erhaltenen Kohlenstoffatomen gebildet. Die Proben wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop (SEM) (S-4200, Hitachi) vor und nach der Kohlenstoffabscheidung untersucht und energiedispersive Röntgenstrahlenspektren (EDX) wurden durch einen an dem SEM angebrachten SiLi-Detektor aufgezeichnet. Um eine Probe für ein Transmissionselektronenmikroskop (TEM) herzustellen, wurde die Probe in einem Mörser zermahlen und in Ethanol suspendiert; ein Tropfen wurde dann auf einem löchrigen Kohlenstoff-Kupfer-Netz plaziert und in einem JEM-200-ex-Mikroskop untersucht, um die Kohlenstoff-Nanoröhren zu charakterisieren.

[0386] Darüber hinaus können Nanokanäle aus anodischem porösen Aluminiumoxid hergestellt werden, welches eine gepackte Anordnung von säulenartigen hexagonalen Zellen mit zentralen, zylindrischen Öffnungen ist, die eine einheitliche Größe von typischerweise von 4 bis 200 nm im Durchmesser aufweisen. Membranen dieses Typs werden elektrochemisch aus Aluminiummetall hergestellt (A. Despic und V. P. Parkhutik, in *Modern Aspects of Electrochemistry*, J. O. Bockris, R. E. White, B. E. Conway, Hrsg. (Plenum, New York, 1989), Bd. 20, Kap. 6.). Porendichten von 10^{11} Poren pro Quadratcentimeter sind erreicht worden (D. AlMawawi, N. Coombs, M. Moskovits, *J. Appl. Phys.* 70, 4421 (1991)). Membranen, die Porendurchmesser von nur 5 nm aufweisen, sind mit Hilfe dieses Verfahrens hergestellt worden (und es wird angenommen, daß selbst kleinere Poren hergestellt werden können) Martin, C. R., *Science*, 266: 1961 (1994).

[0387] Matsuda und Fukuda haben eine Modifikation von porösen Aluminiumoxidmembranen beschrieben. Die Membranen, die hochgeordnete Metall- (Platin- und Gold-) Anordnungen von Nanoöffnungen sind, werden

unter Verwendung einer zweistufigen Nachbildung der Bienenwabenstruktur von anodischem porösen Aluminiumoxid hergestellt. Die Herstellung der negativen porösen Struktur von porösem Aluminiumoxid mit anschließender Bildung der positiven Struktur aus Metall führt zu einer geometrischen Struktur, die mit derjenigen von anodischem porösen Aluminiumoxid identisch ist. Das Verfahren ermöglicht daher die Herstellung der Lochanordnungen von anodischem porösen Aluminiumoxid mit anderen gewünschten Materialien statt Aluminiumoxid. Matsuda und Fukuda, *Science*, 268: 1466 (1995). Das Verfahren von Matsuda und Fukuda wird unten zusammengefaßt.

[0388] Anodisches Aluminium wurde unter Verwendung einer Langzeit-Anodisierung von Aluminiumoxid auf einem Substrat bei 40 V hergestellt, was zu einer minimalen Zahl von Defekten und Dislokationen führte, mit anschließender Entfernung des Aluminiumsubstrates und des Bodenteils der porösen Schicht mit gesättigtem HgCl_2 . Das Material wurde dann in 5 Gewichtsprozent Phosphorsäure bei 30°C getaucht, um den Porendurchmesser anzupassen. Eine dünne Metallschicht wurde durch Vakuumabscheidung auf dem Boden des anodischen porösen Aluminiumoxids abgeschieden, um einen Katalysator oder eine Elektrode für den nachfolgenden Metallplattierungsprozeß zu erzeugen. Im allgemeinen wird für die Verdampfung dasselbe Metall wie für die Erzeugung des Gerüsts verwendet. Metallmethacrylatmonomer mit einem Polymerisationsinitiator wie 5 Gewichtsprozent Benzoylperoxid wurde unter Vakuumbedingungen in die Öffnungen injiziert und durch ultraviolette Strahlung polymerisiert. Die Aluminiumoxidschicht wurde dann mit NaOH entfernt und eine negative poröse aluminiumoxidartige Struktur aus Poly(methylmethacrylat)(PMMA) erhalten. Aus der PMMA-Form wurde durch stromlose Abscheidung von Platin wie folgt eine positive Struktur gebildet. Das PMMA vom Negativtyp wurde in die stromlose Plattierungslösung getaucht, was dazu führte, daß am Bodenteil der zylindrischen Struktur Metall abgeschieden wurde und das Metall den Hohlraum des Negativtyp-PMMA bis zum oberen Ende ausfüllte. Alternativ wurde eine Lochanordnung aus Gold (Au) durch elektrochemische Abscheidung von Au in den Mikrohohlraum des PMMA unter konstanten Bedingungen hergestellt. Das poröse Metall wurde durch Lösen des PMMA mit Aceton erhalten.

[0389] Andere nanoporöse Materialien, die im Stand der Technik beschrieben wurden, beinhalten eine Nanokanal-Glasanordnung mit Porendichten von bis zu 3×10^{10} Poren pro Quadratcentimeter (R. J. Tonucci, B. L. Justus, A. J. Campillo, C. E. Ford, *Science* 258, 783 (1992) und Pearson und Tonucci, *Science*, 270: 68 (1995)). Douglas et al. haben gezeigt, daß die nanoskopischen Poren in einem Protein, das von einem Bakterium erhalten wurde, verwendet werden können, um ein Abbild dieser Poren auf eine unterliegende Struktur zu übertragen (Douglas, et. Al., *Science* 257: 642 (1992)). Schließlich hat Ozin viele verschiedene nanoporöse Feststoffe beschrieben, die als Vorlagenmaterialien verwendet werden können (Ozin, G. *Adv. Mater.* 4: 612 (1992)). Nishizawa et. al., beschreiben die Herstellung von Metall-Nanoröhrenmembranen mit solch kleinen Radien wie 0,8 nm (Nishizawa et. al., *Science* 268: 700 (1995), wobei Nanoröhren beschrieben werden, die durch Plattierung von Gold auf die Wände von Poren einer kommerziell erhältlichen Polycarbonat-Filtermembran (Poretics), die zylinderförmige Nanoporen mit einem einheitlichen Radius (25 nm, 6×10^8 Poren pro Quadratcentimeter) enthält, die die vollständige Dicke (6 µm) der Membran durchziehen, gebildet wurden. "Die Dicke der Au-Schichten, die an den Porenwänden abgeschieden werden, kann durch verändern der Plazierungszeit kontrolliert werden. Im Ergebnis kann der innere Radius der Au-Nanoröhren bewußt verändert werden [wie durch Messung des Gas(He)-Flusses über die die Röhren enthaltende Membran festgestellt wurde]". Berggren et. al., haben Verfahren für die Nanolithographie unter Verwendung von selbstaggregierten Monoschichten und einem Strahl aus neutralem inerten Gas beschrieben. Berggren et. al., *Science* 269: 1255–1257 (1995).

[0390] La Silva et al. beschreiben eine Technik zur Herstellung einfacher Metallstrukturen mit einem Rastertunnelmikroskop (STM), die Abmessungen von 10ern zu 100ern von Nanometern aufweisen und teilweise elektrisch von ihrer Umgebung isoliert sind. Das Verfahren wird durchgeführt durch Abscheidung eines sehr dünnen Metallfilms auf einem isolierenden Substrat und Verwenden der Spitze zur Einarbeitung von Lücken durch den Film, wo eine laterale elektrische Isolation gewünscht ist. (*Journal of Vacuum Science & Technology B*, (1993) 11: 1992–1999).

[0391] Das Wandmaterial kann in einer Weise konstruiert werden, die optimal zur Auflösung benachbarter Einheiten des Polymers ist. Da der Zweck des Wandmaterials darin besteht, eine Umgebung bereitzustellen, die für die Erzeugung eines Signals förderlich ist, können die Materialien, die zur Herstellung des Wandmaterials verwendet werden, dafür ausgewählt sein, diesen Prozeß zu unterstützen. Wenn das Mittel in dem Wandmaterial eingebettete ist, ist das das Mittel umgebende Wandmaterial bevorzugt ein nichtleitendes oder lichtdurchlässiges Material. Mindestens zwei andere Mechanismen zur Optimierung des Wandmaterials bei einer Vorrichtung, die zur Auflösung benachbarter markierter Basen Fluorophore aufweist, die in der den Kanal umgebenden Wand eingebettet sind, beinhalten die Verwendung von dünnen leitenden Schichten und die Kontrolle der Radien von Donor-Fluorophoren um jeden Kanal.

[0392] Leitenden Schichten verhindern die Übertragung von Försterenergie durch elektrische Abschirmung. **Fig. 6** zeigt eine Anordnung der leitenden Schichten in bezug auf die nicht leitenden Schichten, die die Donor-Fluorophor enthält. Der leitende "Sandwich" erzeugt einen definierten Bereich, in dem ein Energietransfer auftritt, und dies trägt dazu bei, die Basenauflösung zu optimieren. Der Transfer von Försterenergie tritt auf Grund einer elektrischen Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen einem Donor und Akzeptor auf. Die Begründung für die Verwendung von leitenden Schichten für den Fall, daß das erzeugte Signal von FRET abhängt, besteht darin, daß FRET von einem elektrischen Feld abhängt und die Anordnung eines elektrischen Schutzschildes zwischen dem Donor und Akzeptor den Energietransfer verhindert. Es ist erforderlich, die Grundlage des Energietransfers vollständig zu verstehen. Einfallendes Anregungslicht erzeugt ein elektrisches Feld in dem Donor, weil das Licht Übergänge in dem Donor induziert, oder dazu führt, daß Elektronen in dem Donor oszillieren (Selvin, 1995). Dies erzeugt ein induziertes Dipolmoment in dem Donor, das wiederum sein eigenes elektrisches Feld erzeugt. Ein Energietransfer tritt auf, wenn ein Akzeptor in das elektrische Feld des Donors gebracht wird. In der Folge werden Übergänge in dem Akzeptor induziert, die ein induziertes Dipolmoment, p_A , erzeugen. Die Größe des Dipolmoments steht in Beziehung zur Größe des elektrischen Feldes des Donors: $p_A = \alpha_A E_p$, wobei α_A die Polarisierbarkeit des Akzeptors ist. Die Menge der von dem Akzeptor absorbierten Energie beträgt $p_A E_p = \alpha_A E_p^2$, wodurch sich die $1/R^6$ -Abhängigkeit der Rate des Energietransfers ergibt.

[0393] Die Theorie der elektrischen Abschirmung wird in den meisten einführenden Physikbüchern dargestellt. Purcell, 1985, gibt eine klare Erklärung. Die Potentialfunktion innerhalb der Box, $\psi(x, y, z)$, muß die Laplace-Gleichung, $\nabla^2 \psi = 0$, erfüllen. In Anbetracht der Kenntnis von Leitern ist die Grenze des Leiters ein Potentialausgleich, was bedeutet, daß $\psi = \psi_0$ ist, eine konstante Funktion überall auf der Oberfläche des Leiters. Eine offensichtliche Lösung der Laplace-Gleichung ist $\psi = \psi_0$ durch das ganze Volumen. Nach dem Eindeutigkeitstheorem kann es nur eine Lösung geben, was bedeutet, daß die Antwort lautet $\psi =$ eine Konstante. Das elektrische Feld einer konstanten Potentialfunktion ist null, weil $E = -\text{grad } \psi$. Das elektrische Feld ist daher überall in der Box null.

[0394] Das Modell einer Box mit einem offenen Loch kann auf eine Nanokanalplatte angewendet werden, weil eine Nanokanalplatte im wesentlichen eine leitende Box mit vielen "Löchern" ist. Betrachten wir die **Fig. 7A** und **7B**. **Fig. 7A** zeigt eine vollständige Nanokanalplatte mit Nanokanälen **90**. Die Schicht aus Donor-Fluorophoren **88** ist durch die leitende "Box" eingeschlossen. Auf diese Weise kann auf Grund einer elektrischen Abschirmung **92** kein Energietransfer zu den Donor-Fluorophoren außerhalb der Box stattfinden. Es sei daran erinnert, daß die Grundlage des Energietransfer elektrisch ist. An der Randbedingung des Nanokanals, der äußeren Oberfläche der Nanokanalplatte, ist $\psi = \psi_0$, eine Ausgleichspotentialoberfläche. Eine logische Lösung für die Laplace-Gleichung ist, daß überall innerhalb der Randbedingung $\psi =$ konstant ist. Aus dem Eindeutigkeitstheorem ergibt sich dies als einzige mögliche Antwort und daher ist überall innerhalb der leitenden Nanokanal-"Box" $E = 0$, weil $E = -\text{grad } \psi$. Die Schlußfolgerung ist, daß Akzeptor-Fluorophore von außerhalb der Box keinen Energietransfer durchmachen können. Selbst innerhalb eines Nanokanals, wie in **Fig. 7B** dargestellt, ist der Energietransfer geometrisch begrenzt. An jeder Position, an der das Akzeptormolekül sich nicht in der Ebene der Donor-Fluorophore befindet, ist die Menge des Energietransfers limitiert. In **Fig. 7B** wird die Menge von Donor-Fluorophoren, die keinen Energietransfer durchmachen können, durch einen Winkel Θ eingeschlossen, der für alle Zwecke sehr groß ist, sofern der Akzeptor-Fluorophor nicht direkt in der Ebene der Donor-Fluorophore liegt, was die erwünschte Konfiguration ist.

[0395] Die Konsequenz aus der leitfähigen Schicht ist, daß bei Passage eines markierten Nukleotids durch den Nanokanal ein scharfes Signal erzeugt wird. **Fig. 8A** und **Fig. 8B** zeigen die Signalerzeugung bei Passage einer Akzeptor-Markierung durch den Nanokanal. **Fig. 8A** zeigt eine vergrößerte Darstellung eines Nanokanals **98**. Nur ein Teil der leitenden Schichten **94** ist dargestellt. Die lichtundurchlässige Polycarbonatschicht ist nicht dargestellt. Eine Akzeptor-Markierung **100** auf einem DNA-Strang bewegt sich durch den Nanokanal vom Boden zur Spitze, startend bei Position A und sich zu Position C bewegend. FRET kann nur an Position B auftreten, weil die leitenden Schichten jede Wechselwirkung des Donor-Fluorophors **96** mit dem Akzeptor an den Positionen A und C abschirmen. **Fig. 8B** veranschaulicht grafisch die scharfen Änderungen in der Donor-Intensität, wenn eine Akzeptor-Markierung sich von der Position A nach C bewegt. Der mittleren Bereich der Grafik gibt die Ebene der Donor-Fluorophor an. Die äußeren Bereiche der Grafik geben die Ebenen der leitenden Schicht an. An der Schnittstelle zwischen den leitenden und den Donor-Fluorophor-Schichten ergeben sich drastische Änderungen der Donor-Intensität aufgrund elektrischer Abschirmung.

[0396] Es ist klar, daß die Auflösung von benachbarten Basen mit leitenden Schichten gelöst werden kann. Durch Erzeugung eines leitenden "Sandwich", bei dem die Dicke der Donor-Fluorophore geringer ist als die Steighöhe einer B-DNA-Helix (3,4 Å), an die gewünschte Auflösung erreicht werden. Dünne Filme dieser Dicke können leicht mit Plasma-, Lösungs-, chemischen Gasphasen- oder Ionenstrahlabscheidungsverfahren her-

gestellt werden (Spohr, 1990; Valiev, 1992; Konuma, 1992; Pauleau, 1995; Bruno et al., 1995; Dash, 1975; Stuart, 1983; Morosanu, 1990). Es ist jedoch nicht wünschenswert, einen Donor-Fluorophorfilm von weniger als 3,4 Å zu verwenden, wie unter der nächsten Überschrift beschrieben sein wird. Kurz gesagt, gestatten Fluorophore, die in eine dickere Schicht eingebettet sind, die Messung einer momentanen Bewegungsgeschwindigkeit von DNA. Durch Messung der Zeit, die ein markiertes Nukleotid in der dicken Schicht verweilt, und durch Kenntnis der Abmessungen der Schicht ist die Rate der DNA-Bewegung bekannt, was wichtig ist zur Bestimmung von Abständen zwischen markierten Nukleotiden.

[0397] Ein anderes Beispiel für ein Verfahren zur genauen Auflösung benachbarter markierter Basen besteht darin, die Radien der Donor-Fluorophore um jeden Nanokanal zu kontrollieren. Die Menge Energie, die für zwei Akzeptor-Markierungen in Gegenwart eines konzentrischen Ringes von Donor-Fluorophoren übertragen wird, ist größer als die Energie, die für eine Akzeptor-Markierung übertragen wird. Die Detektion der Differenz zwischen der für ein und zwei Akzeptoren übertragenen Energie ermöglicht die Auflösung von benachbarten Basen. Damit die Donor-Fluorophore mit mehr als einem Akzeptor wechselwirken können, muß die Dicke der Donor-Fluorophore größer sein als die Ganghöhe der Helix.

[0398] Darüber hinaus müssen die Radien der Donor-Fluorophoren größer sein als R_{gleich} für einen Akzeptor (siehe Fig. 6). Ein Radius größer als R_{gleich} für einen Akzeptor ermöglicht die weitere Abnahme der Donor-Intensität in Gegenwart von mehr als einem Akzeptor. Ein Radius von R_{gleich} bedeutet, daß bei Passage von einem Akzeptor die Donor-Intensitätsabnahme gleich 100% ist. In diesem Fall ergibt die Passage von zwei benachbarten Akzeptoren dasselbe detektierte Signal wie ein Akzeptor.

[0399] Fig. 9 zeigt schematisch die Passage eines zweibasemarkierten DNA-Strangs **102** durch einen Nanokanal **104** mit geeigneter Dicke und geeigneten Radien von Donor-Fluorophoren **108**, die sandwichartig zwischen leitendem Material **106** angeordnet sind. Die mit "A" bis "D" bezeichneten Positionen entsprechen den Markierungen auf der Grafik, die auf der rechten Seite der Darstellung wiedergegeben ist. Anfangs befinden sich die Akzeptor-Markierungen auf der DNA an Position A. Ein Energietransfer ist an dieser Position nicht möglich, so daß die Donor-Intensität auf ihrem Maximum bleibt. Die weitere Bewegung der DNA ermöglicht es einem Akzeptor, einen Energietransfer mit den Donor-Fluorophoren (B) durchzumachen und eine starke Abnahme der Donor-Intensität tritt auf. An Position C können zwei Fluorophore einen Energietransfer durchmachen, was zu einer weiteren Abnahme der Donor-Intensität führt. Schließlich verlassen die beiden Akzeptor-Markierungen den Bereich der Donor-Fluorophore, ein Energietransfer ist nicht länger möglich, und die Donor-Intensität kehrt zu ihrem Maximum zurück (D).

[0400] Die Änderung in der Donor-Emission in Gegenwart von einem oder zwei Akzeptoren kann visuell ohne mathematische Quantifizierung gezeigt werden. Fig. 10A veranschaulicht die Größe der Änderung als Volumina. Die Darstellungen zeigen die Menge der transferierten Energie als festes Volumen **110**. Die ursprünglichen Donor-Intensität ist wiedergegeben als das Volumen in Form einer Scheibe **112**. Fig. 10B zeigt die Änderung für einen Akzeptor. Die rechte Darstellung ist für zwei Akzeptoren. Die Abklingkurven repräsentieren die Rate des Energietransfers in bezug auf die durch die Förster-Gleichung gegebene radiale Distanz. Die Abklingkurve für zwei Akzeptoren beträgt ungefähr das Doppelte derjenigen für einen Akzeptor. Die Raten der Donor-Emission und des Energietransfers sind in Einheiten von $1/s \text{ nm}^2$ angegeben. Die Integration der Rate der Donor-Emissionsabnahme über den Oberflächenbereich des Energietransfers ergibt die Netto-Abnahme der Donor-Emission. Dies ist als der über 2π integrierte schattierte Bereich unter jeder Abklingkurve dargestellt. Bei Kenntnis der ursprünglichen Donor-Emission (schattierter rechteckiger Bereich integriert über 2π) kann die prozentuale Abnahme der Donor-Emission ermittelt werden.

[0401] Mathematisch können die Änderungen leicht errechnet werden. In beiden Fällen ist die Änderung gleich dem schraffierten Bereich (Fig. 10), integriert über 2π . Für die Berechnung müssen die Raten der Donor-Emission und des Energietransfers in den geeigneten Einheiten von $1/s \text{ nm}^2$ ausgedrückt werden. Hierzu ist die Dichte der Donor-Fluorophore, gegeben als N/A , in den Geschwindigkeitsgleichungen einzusetzen, wobei N_D die Zahl der Fluorophore und A die von den Donor-Fluorophoren eingenommene Fläche ist. Entsprechend ist die Emissionsrate gegeben als:

$$k_{\text{emit}} = \frac{I \xi \rho N_D}{h\nu A}$$

[0402] Die Energietransferrate ergibt sich zu:

$$k_{\text{Transfer}} = \frac{N_D N_A}{\tau_D A} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

[0403] Wobei N_A die Anzahl der Akzeptoren ist, die einen Energietransfer mit den Donoren durchmachen können. Die allgemeine Gleichung für die schraffierten Flächen integriert über 2π ist wie folgt:

$$\pi(R_{\text{gleich}}^2 - R_{\text{kanal}}^2)K_{\text{emit}} + \int_0^{2\pi R_{\text{Donor}}} \int_{R_{\text{gleich}}} k_{\text{Transfer}} r dr d\theta$$

[0404] Für die momentanen Berechnungen ist $R_{\text{Donor}} = 55 \text{ nm}$, $N_D = 1000$. Die Donor-Fluorophor-Dichte (N_D/A) wird $0,11 \text{ Fluorophore/nm}^2$. Dieser Wert ist nicht unangemessen, da die Größe der Fläche des größten möglichen Fluorophors 1 nm^2 beträgt. Dies bedeutet, daß die Dichte mindestens eine Größenordnung niedriger ist als die höchstmögliche Fluorophordichte.

[0405] Um die allgemeine Gleichung zu lösen, erinnern wir uns daran, daß R_{gleich} gelöst werden kann, indem $k_{\text{emit}} = k_{\text{Transfer}}$ gesetzt wird, was zur folgenden Gleichung führt:

$$R_{\text{gleich}} = \frac{R_0}{\sqrt[6]{\tau_D I \xi \rho / N_A h \nu}}$$

[0406] Es ist auch wichtig, die ursprüngliche Donor-Emission (E_0) zu kennen, die gegeben ist durch:

$$E_0 = k_{\text{emit}} \Pi(R_{\text{Donor}}^2 - R_{\text{kanal}}^2)$$

[0407] Bei Verwendung der Werte aus obigen Tabelle 3 ist es möglich, die Donoremissionswerte für eine verschiedene Anzahl von Akzeptoren anzugeben, die sich in einer Position befinden, in der sie einen Energietransfer durchmachen können (Tabelle 4). Die Werte für $N_A = 1-5, 11-12$ sind als Beispiele berechnet worden. Es wird erwartet, daß der Wert für die erste Donoremissionsabnahme am größten ist. Nachfolgende Abnahmen werden zunehmend kleiner. Wenn R_{gleich} sich R_{Donor} annähert, wird erwartet, daß die aktuelle (nicht prozentuale) Änderung gegen Null geht. Dies ist so, weil die Donor-Moleküle im wesentlichen nahezu vollständig gedämpft sind.

[0408] Die prozentualen Änderungen und die Signal-Rausch-Verhältnisse bestimmen die Detektionsmöglichkeit, nicht die absolute numerische Änderung der Donor-Emission. Wie erwartet, nehmen die SRVs mit zunehmender Zahl der Akzeptoren ab, weil eine stärkere Donor-Dämpfung auftritt. Anders ausgedrückt, die Donor-Emission wird kleiner. Diese Abnahme im SRV wird durch zunehmende prozentuale Änderungen von $N_A = 5$ bis 12 kompensiert. Das Vertrauen wird berechnet unter Verwendung des SRV und der prozentualen Änderung. Das Vertrauen für die Detektion der Änderung von einem zu zwei Akzeptoren verwendet zum Beispiel das SRV für einen Akzeptor und die prozentuale Änderung von einem zu zwei Akzeptoren. In diesem Fall ergibt sich ein 95%iges Vertrauen für die Detektion einer 0,483%igen Änderung. Da die prozentuale Änderung groß ist, 29,1%, wird die Signaländerung von einem zu zwei Akzeptoren mit 100% Vertrauen detektiert. Die obigen Berechnungen zeigen, daß mehrere benachbarte Akzeptoren mit hoher Effizienz detektiert werden können.

Tabelle 4				
N_A	Donor-Emission	% Änderung gegenüber vorher	SNR (80% Sättigungsladung bei $E_0, N_A=0$)	Vertrauen
0	$2,5572 \times 10^7$	--	632:1	~100 %
1	$1,0943 \times 10^7$	57,2 %	413:1	" "
2	$7,7510 \times 10^6$	29,1 %	348:1	" "
3	$5,7650 \times 10^6$	25,6 %	300:1	" "
4	$4,3560 \times 10^6$	24,4 %	261:1	" "
5	$3,2440 \times 10^6$	25,5 %	225:1	" "
"	"	"	"	"
11	$3,8200 \times 10^5$	--	77:1	" "
12	$2,1200 \times 10^5$	44,5 %	58:1	" "

[0409] Eine bei der obigen Gleichung gemachte Annahme ist, daß die Donor-Emission während der Passage eines Fluorophors durch die Donor-Fluorophor-Schicht konstant bleibt. Es sei daran erinnert, daß die Donor-Fluorophor-Schicht aus einer Monoschicht von Fluorophoren bestehen kann, die eingebettet sind in einem klaren lichtleitenden Medium. Der Bereich des Energietransfers für einen Akzeptor in der Nähe des Ausgangs des Nanokanals ist geringer als der Bereich beim anfänglichen Eintritt in den Kanal. Diese Änderung ist in der Tat wesentlich, wie unten mathematisch gezeigt wird. Wenn man berücksichtigt, daß die Änderung höhere Signal-Rausch-Verhältnisse und größere Änderungen in der Donor-Intensität für zusätzliche Akzeptoren ergibt. Dies bedeutet, daß die Werte in Tabelle 4, die eine sehr effiziente Signalerzeugung/-detektion zeigen, tatsächlich noch ein wenig höher sind.

[0410] Die Änderung der Donor-Emission bei der Passage eines Akzeptors durch die Donor-Fluorophor-Schicht wird durch Berechnung anhand der folgenden Formeln bestimmt. Es wird erwartet, daß die Energietransfermenge auf Grund eines kleineren wirksamen Energietransferbereichs abnimmt, wenn ein Akzeptor die Donor-Schicht durchläuft. Die Folge dieser Abnahme ist, daß die Donor-Emission größer ist als in den vorhergehenden Berechnungen. Eine höhere Donor-Emission bedeutet ein höheres SRV. Man stelle sich vor, daß ein Akzeptor eine kurze Distanz in die Donor-Schicht eingetreten ist. Eine kurze Zeit später tritt ein anderer Akzeptor in die Donor-Schicht ein. Die Anwesenheit eines weiteren Akzeptors ergibt eine Abnahme in der Donor-Emission. Die prozentuale Änderung ist groß. In der Tat ist sie größer als die vorherigen Berechnungen. Die Kombination aus höheren SRVs und größeren prozentualen Änderungen bedeutet, daß die Detektionseffizienzen größer sind als vorher angenommen. Komplexe Markierungsmuster, wie beispielsweise die Markierung aller paar Nukleotide, können bei Einsatz dieses Systems unterschieden werden.

[0411] Die Gleichung für die Donor-Emission, wenn sich der Akzeptor auf der gleichen Ebene wie die Donor-Fluorophore befindet, ist wie folgt:

$$k_{emit} \pi(R_{Donor}^2 - R_{Kanal}^2) - [k_{emit} \pi(R_{gleich}^2 - R_{Kanal}^2) + \int_0^{2\pi R_{Donor}} \int_{R_{gleich}} k_{Transfer} r dr d\theta]$$

[0412] Es sei an die Gleichungen für k_{emit} und $k_{Transfer}$ erinnert:

$$k_{emit} = \frac{I \xi \rho N_D}{h \nu A} \quad k_{Transfer} = \frac{N_D}{\tau_D A} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

[0413] Die ursprüngliche Donoremissionsfunktion sei als radiale Distanz (x) und Distanz des Akzeptors von der Donor-Schicht (d) ausgedrückt mit den folgenden Substitutionen:

$$dr = \frac{x}{\sqrt{x^2 + d^2}} dx \quad r = \sqrt{x^2 + d^2}$$

[0414] Die erhaltene Gleichung ergibt zusammen mit der Substitution der Gleichung für k_{Transfer} :

$$k_{\text{emit}} \pi(R_{\text{Donor}}^2 - R_{\text{Kanal}}^2) - [k_{\text{emit}} \pi(x_{\text{gleich}}^2 - R_{\text{Kanal}}^2) + 2\pi \frac{N_D R_0^6}{\tau_D A} \int_{x_{\text{gleich}}}^{R_{\text{Donor}}} \frac{x}{(x^2 + d^2)} dx$$

[0415] Es sei $u = x^2 + d^2$. Es folgt, daß $dx = du/dx$.

$$k_{\text{emit}} \pi(R_{\text{Donor}}^2 - R_{\text{Kanal}}^2) - [k_{\text{emit}} \pi(x_{\text{gleich}}^2 - R_{\text{Kanal}}^2) + 2\pi \frac{N_D R_0^6}{\tau_D A} \int_{u-x_{\text{gleich}}^2+d^2}^{u-R_{\text{Donor}}^2+d^2} \frac{1}{(2u^3)} du]$$

$$k_{\text{emit}} \pi(R_{\text{Donor}}^2 - R_{\text{Kanal}}^2) - [k_{\text{emit}} \pi(x_{\text{gleich}}^2 - R_{\text{Kanal}}^2) + (2\pi \frac{N_{DR_0^6}}{\tau_{DA}}) (\frac{1}{4(x_{\text{gleich}}^2 + d^2)^2} - \frac{1}{4(R_{\text{Donor}}^2 + d^2)^2})]$$

[0416] Bei Einsetzen von

$$x_{\text{gleich}} = \sqrt{R_{\text{gleich}}^2 - d^2}$$

wird aus der erhaltenen Emissionsfunktion:

$$E(d) = k_{\text{emit}} \pi(R_{\text{Donor}}^2 - R_{\text{Kanal}}^2) - [k_{\text{emit}} \pi(R_{\text{gleich}}^2 - d^2 - R_{\text{Kanal}}^2) + (2\pi \frac{N_{DR_0^6}}{\tau_{DA}}) (\frac{1}{4R_{\text{gleich}}^4} - \frac{1}{4(R_{\text{Donor}}^2 + d^2)^2})]$$

[0417] Die erhaltene Donoremissionsgleichung kann gegen den Abstand aufgetragen werden.

Abstand	Donor-Emission (Photonen/s)	% Änderung gegenüber dem Ursprung
0	$1,09425 \times 10^7$	-
20 Å	$1,09740 \times 10^7$	0,023 %
40 Å	$1,0692 \times 10^7$	1,158 %
60 Å	$1,12278 \times 10^7$	2,607 %
80 Å	$1,14501 \times 10^7$	4,638 %
100 Å	$1,17365 \times 10^7$	7,256 %

$$E_2(d) = k_{\text{emit}} \pi(R_{\text{Donor}}^2 - R_{\text{Kanal}}^2) - [k_{\text{emit}} \pi(x_{\text{gleich}}^2 - R_{\text{Kanal}}^2) + (2\pi \frac{N_{DR_0^6}}{\tau_{DA}}) (\frac{1}{4(R_{\text{gleich}}^2 + d^2)^2} - \frac{1}{4(R_{\text{Donor}}^2 + d^2)^2})]$$

$$+ (2\pi \frac{N_D R_0^6}{\tau_{DA}}) (\frac{1}{4R_{\text{gleich}}^4} - \frac{1}{4(R_{\text{Donor}}^2 + d^2)^2})]$$

[0418] Um Lösungen für die obige Gleichung zu finden, muß R_{gleich} durch Gleichsetzen von k_{emit} mit der Summe des Energietransfers für die zwei Akzeptoren ermittelt werden. Die Lösung für R_{gleich} in der unten angegebenen Gleichung erfolgt mit Hilfe eines Computers.

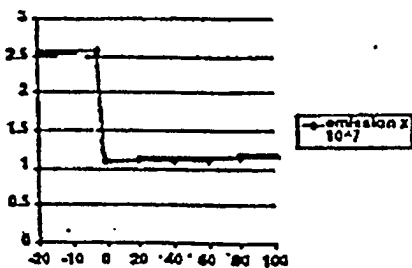
$$k_{\text{emit}} = k_{\text{Transfer}(1)} + k_{\text{Transfer}(2)} \Rightarrow \frac{I \xi \rho N_D}{h\nu A} = \frac{N_D}{\tau_D A} \left(\frac{R_0}{R_{\text{gleich}}} \right)^6 + \frac{N_D^6}{\tau_D} \frac{R_0^6}{(R_{\text{gleich}}^2 + d^2)^3}$$

[0419] Die prozentuale Änderung der Donor-Emission von einem zu zwei Akzeptoren ist tabelliert.

Abstand (d)	R_{gleich} 2 Akzeptoren	$E_2(d)$	$E_1(d)$	% Änderung	SRV
0	39,28	$7,7510 \times 10^8$	$1,0943 \times 10^7$	29,10 %	348,0:1
20 Å	39,21	$7,7661 \times 10^8$	$1,0974 \times 10^7$	29,24 %	348,3:1
40 Å	39,11	$7,8102 \times 10^8$	$1,1069 \times 10^7$	29,44 %	349,3:1
60 Å	39,01	$7,8815 \times 10^8$	$1,1228 \times 10^7$	29,80 %	350,9:1
80 Å	38,82	$7,9790 \times 10^8$	$1,1450 \times 10^7$	30,31 %	353,1:1
100 Å	38,610	$8,0962 \times 10^8$	$1,1737 \times 10^7$	31,01 %	355,7:1

$$\% \text{ Änderung} = \frac{E_1(d) - E_2(d)}{E_1(d)} \times 100$$

[0420] Eine Basenauflösung bis hin zu einzelnen Basen kann daher erreicht werden. Eine logische Folge aus diesem Basenauflösungsgargument ist, daß die Zeit, die ein einzelner Akzeptor in der Donorschicht verweilt, festgestellt werden kann. Dies führt zu Informationen über die augenblicklichen Geschwindigkeiten der DNA-Bewegung.



[0421] Um die optimale lineare Querung eines Polymers quer durch einen Kanals zu erreichen, ist es wichtig, den Kanaldurchmesser zu berücksichtigen sowie das Verfahren, das verwendet wird, um das lineare Queren z. B. eines elektrischen Feldes durch das Polymer zu steuern. Der Durchmesser des Kanals sollte dem des markierten Polymers gut entsprechen. Die Theorie für die lineare Querung ist, daß der Durchmesser des Kanals mit dem des Polymers gut übereinstimmt. Die ringartigen Gleitklammern von DNA-Polymerasen besitzen beispielsweise interne Durchmesser, die gut mit dem Durchmesser doppelsträngiger DNA übereinstimmen und sind erfolgreich darin, eine lineare Querung eines DNA-Moleküls zu erreichen. Viele Kilobasen DNA können durch die Gleitklammern eingefädelt werden. Mehrere Literaturstellen haben auch gezeigt, daß lineare Querung von DNA durch Kanäle auftritt, wenn der Durchmesser der Kanäle gut mit dem Durchmesser der DNA übereinstimmt. (Bustamante, 1991; Gurrieri et al., 1990; Matsumoto et al., 1981).

[0422] Einzelsträngige DNA, wie in diesem Experiment verwendet, weist einen Durchmesser von ~1,6 nm auf. Ein Kanal mit einem inneren Durchmesser von ungefähr 1,7–3 nm ist ausreichend, um die lineare Querung eines einzelsträngigen DNA-Molekül zu ermöglichen. Die Durchmesser des Kanals und der DNA müssen nicht genau zusammenpassen, es ist jedoch bevorzugt, daß sie ähnlich sind. Für doppelsträngige DNA, die einen Durchmesser von 3,4 nm aufweist, sind Kanalgrößen zwischen 3,5 nm und 4,5 nm ausreichen, um eine lineare Querung zu ermöglichen.

[0423] Wie vorher beschrieben, können viele Verfahren verwendet werden, um das Polymer linear durch den Kanal und an der Wechselwirkungsstation oder der Signalerzeugungsstation vorbei zu bewegen. Ein bevorzugtes Verfahren gemäß der Erfindung verwendet ein elektrisches fällt. Ein elektrisches Feld kann verwendet werden, um ein Polymer durch einen Kanal zu ziehen, weil das Polymer gestreckt und in Richtung des angelegten Feldes ausgerichtet wird, wie vorher in mehreren Studien gezeigt wurde (Bustamante, 1991; Gurrieri et al., 1990; Matsumoto et al., 1981). Die ähnlichsten Versuche bezüglich der linearen Querung von Polymeren durch Kanäle ergeben sich durch Experimente, bei denen polymere Moleküle mit elektrischen Feldern durch Proteinkanäle gezogen werden, wie in Kasianowicz et al., 1996 und Bezrukov et al., 1994, beschrieben. Eine kurze Beschreibung dieser Versuche ist unten wiedergegeben, um ein Verfahren zu veranschaulichen, das die

lineare Querung eines Polymers ermöglicht.

[0424] In einer Studie mit dem Titel "Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel," zeigten Kasianowicz et al., 1996, die lineare Querung eines DNA-Moleküls durch Proteinkanäle in einer Lipid-Doppelschicht mit einem elektrischen Feld (auch in der veröffentlichten PCT-Patentanmeldung WO 96/29593 beschrieben). Ein Auszug aus der Zusammenfassung folgt:

[0425] Wir zeigen, daß ein elektrisches Feld einzelsträngige RNA- und DNA-Moleküle durch einen Ionenkanal mit einem Durchmesser von 2,6 nm in einer Lipid-Doppelmembran bewegen kann. Da der Kanaldurchmesser nur eine einzelsträngige RAN oder DNA aufnehmen kann, durchquert jedes Polymer die Membran als eine ausgebreitete Kette, die den Kanal teilweise blockiert.

[0426] Der Test wird unter Verwendung von Staphylococcus-aureus-Hämolyisin als Membrankanal durchgeführt. Dieser hat einen Durchmesser von 2,6 nm und kann für längere Zeitspannen offenbleiben, was einen kontinuierlichen Ionenstrom über eine Lipid-Doppelschicht ermöglicht. Die Hypothese ist, daß eine Blockade des Ionenstroms stattfinden sollte, während ein DNA Molekül einen Kanal durchquert. Bei Verwendung von Einzelkanal-Aufzeichnungen wird die Blockadezeit aufgezeichnet. Die Länge der Dauer der Blockadezeit entspricht der Länge des einzelsträngigen DNA-Moleküls, das den Kanal passiert, wenn eine lineare Querung auftritt. Anfangs wurde ein Potential von -120 mV über die Membran erzeugt, was einen Stromfluß hervorrief. Als einzelsträngige DNA zugegeben wurde, traten zwei aufeinanderfolgende Leitfähigkeitsblockaden von 300 µs beziehungsweise 1300 µs auf.

[0427] Die Daten unterstützen zwei Hypothesen: 1) die Länge der Blockadezeit (bezeichnet als "Lebensdauer") ist direkt proportional zur Länge der DNA und 2) eine größere angelegte Spannung verkürzt die Blockadezeit für eine gegebene DNA-Länge, was darauf hindeutet, daß in der Tat eine lineare Querung auftrat. Als Kontrolle wurde gezeigt, daß doppelsträngige DNA die Proteinkanäle nicht durchquert.

[0428] Bezrukov et al., 1994, haben ähnliche Studien mit Alamethicin-Poren in einem Manuskript mit dem Titel "Counting polymers moving through a single ion channel." beschrieben. Alamethicin-Poren weisen innere Durchmesser von 2 nm auf. Die Dauer der Leitungsblockade war proportional zur Länge des Polymers, das durch die Poren gezogen wurde, was die Hypothese einer linearen Querung unterstützt. Die Ergebnisse von Kasianowicz et al., 1996 und Bezrukov et al., 1994, zeigen, das ein elektrisches Feld eine DNA in einer linearen Weise durch einen Proteinporenkanal steuern kann.

[0429] Ein Versuch wurde durchgeführt, um gemäß der Erfindung zu zeigen, daß DNA hergestellte Nanokanäle passieren kann. Die Ergebnisse des Versuchs sind in **Fig. 11** dargestellt. DNA in verschiedenen Formen wurde Nanokanälen ausgesetzt, um festzustellen, ob diese queren konnten. Lediglich doppelsträngige DNA von 50 kb konnte durch eine Anordnung von 4-nm-Nanokanälen durchtreten. Gefaltete DNA, modelliert durch ein zirkuläres Plasmid derselben Größe, kann die Anordnung nicht durchtreten. Die Spuren **1** und **2** sind Kontrollen. Zirkuläre DNA bewegt sich wie erwartet langsamer als lineare DNA. Die Spuren **3** und **4** zeigen, daß nur lineare DNA die Nanokanalordnung passieren konnte. Da gefaltete DNA, die einen Solvatationsdurchmesser von ungefähr 5 nm aufweist, die Anordnung nicht passieren kann, kann die lineare DNA nur in linearer Weise durch die Platte hindurchtreten.

[0430] Unter Verwendung des oben von Kasianowicz et al. beschriebenen Systems kann ein zufallsmarkiertes Polymer wie DNA durch Passieren des Polymers durch den Kanal und Vornahme einheitspezifischer Messungen analysiert werden. Ein Kanal kann als eine Proteinpore in einer Lipidmembran wie die in Kasianowicz et al. und auch in der veröffentlichten PCT-Patentanmeldung WO/96/29593 beschrieben hergestellt werden. Kurz gesagt, wird das S.-aureus-Protein α -Hämolyisin auf der cis-Seite einer Lipid-Doppelschicht zugegeben. Lipid-Doppelschichten können zum Beispiel aus Diphytanoylphosphatidylcholin hergestellt werden, in dem die Lösung auf 0,2-mm-Bohrungen in einem Teflonfilm geschichtet wird, der zwei Kompartimente mit Pufferlösung trennt. Nachdem das Hämolyisin zugegeben ist, kann eine Spannung über der Doppelmembran angelegt werden und von 0 mV bis zu 140 mV variiert werden. Zufallsmarkierte DNA wird zu dem Puffer auf der cis-Seite des Proteins zugegeben. Eine Spannung wird angelegt, die die markierte DNA veranlaßt, von dieser cis-Seite zur trans-Seite des Kanals, der eine positive Ladung aufweist, zu wandern.

[0431] Wenn jede Einheit den Kanal passiert, tritt eine Änderung der Leitfähigkeit als Folge der Blockade des Kanals auf. Die Änderung in der Leitfähigkeit hängt von der Größe, Gestalt und Ladung der den Kanal passierenden Einheit ab. Wenn die Einheit markiert ist, reflektiert die Leitfähigkeitsänderung die Eigenschaften des Markers wieder. Auf diese Weise können markierte Einheiten identifiziert werden. Dieses Verfahren kann ver-

wendet werden, um eine bestimmte Einheit zu identifizieren oder um eine bestimmte Reihenfolge der Einheiten oder die Distanz zwischen Einheiten oder einfach die Zahl der markierten Einheiten zu bestimmen.

[0432] Eine Rückwärtsbewegung der DNA ist unwahrscheinlich wegen der Unterschiede in den Friktionskoeffizienten innerhalb und außerhalb des Nanokanals. Die vorausgesagte Van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen solvatisierter markierter DNA und dem Inneren des Nanokanals erzeugt einen höheren Reibungswiderstand für den Teil der DNA, der innerhalb des Nanokanals lokalisiert ist, als für den in freier Lösung. Dies wird nachgewiesen durch die langsamere Migration von DNA in Gegenwart einer Nanokanalplatte (vgl. Spuren **1** und **3** in **Fig. 6**). Der Unterschied im Reibungswiderstand erzeugt wahrscheinlich einen Ratschenmechanismus in Richtung der gewünschten DNA-Bewegung.

[0433] Ein anderes Verfahren zur Bewegung eines Polymers linearer entlang einer Wechselwirkungsstation oder einer Signalerzeugungsstation beinhaltet die Verwendung eines Molekülmotors. Ein Molekülmotor ist eine Vorrichtung, die physikalisch mit dem Polymer wechselwirkt und das Polymer an der Station vorbei zieht. Molekülmotoren beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf DNA-Polymerasen und Helikasen. Von DNA-Polymerasen ist gezeigt worden, daß sie als wirkungsvolle Molekülmotoren fungieren. Bevorzugt sind die inneren Durchmesser der Bereiche der Polymerasen, die sich an die DNA anklammern, denen doppelsträngiger DNA ähnlich. Darüber hinaus können große Mengen von DNA in einer linearen Weise durch die Klammern eingezogen werden.

[0434] Die Gesamtstruktur der β -Untereinheit des DNA-Polymerase-III-Holoenzym besitzt einen Durchmesser von 80 Å mit einem inneren Durchmesser von ~35 Å. Im Vergleich hierzu beträgt eine volle Umdrehung der B-Form von Duplex-DNA ~34 Å. Die β -Untereinheit paßt um die DNA, in einem Mechanismus, der als Gleitklammer-Mechanismus bezeichnet wird. Es wird gut verstanden, daß die β -Untereinheit die DNA während der Replikation umgibt, um Prozessivität auf das Holoenzym zu übertragen (Bloom et al., 1996; Fu et al., 1996; Griep, 1995; Herendeen and Kelly, 1996; Naktinis et al., 1996; Paz-Elizur et al., 1996; Skaliter et al., 1996). Da die Gleitklammer der Mechanismus der Prozessivität einer Polymerase ist, bedeutet dies notwendigerweise, daß große Mengen von DNA durch die Klammer in einer linearen Weise durchgezogen werden. Mehrere Kilobasen werden auf einmal durch die Klammer gezogen (Kornberg und Baker, 1991).

[0435] Verfahren zur Herstellung des Wandmaterials gemäß der Erfindung sind ebenfalls von der Erfindung umfaßt. Ein Verfahren zur Herstellung eines Wandmaterials gemäß der Erfindung beinhaltet den Schritt des kovalenten Bindens des Mittels an eine Mehrzahl von diskreten Orten eines Wandmaterials. Das Mittel wird an diskrete Orte auf dem Wandmaterial gebunden, die nahe genug an einer Wechselwirkungsstation liegen, so daß, wenn eine individuelle Einheiten des Polymers, die mit dem Mittel zur Erzeugung eines Signals wechselwirkt, an einer Wechselwirkungsstation positioniert ist, das Mittel mit der individuellen Einheit zur Erzeugung eines Signals wechselwirkt. Die diskreten Orte können auf der Oberfläche des Wandmaterials oder innerhalb des Wandmaterials angeordnet sein, so daß das Mittel in das Wandmaterial eingebettet ist.

[0436] Ein anderes Verfahren ist für die Anbringung einer chemischen Substanz selektiv an einem Rand eines Kanals durch ein Wandmaterial, das opak ist, vorgesehen. Ein "opakes" Material wie hier verwendet ist ein Material, das bei einer ausgewählten Wellenlänge lichtundurchlässig ist.

[0437] Das Wandmaterial ist mit photoprotektiven chemischen Gruppen ausgestaltet, die am Rand des Kanals durch das Wandmaterial befestigt sind. Licht wird anschließend auf die photoprotektiven chemischen Gruppen angewendet, um die chemischen Gruppen zu photoentschützen, und eine chemische Substanz wird an den photoentschützten chemischen Gruppen angeheftet.

[0438] Eine "photoprotektive chemische Verbindung" wie hier verwendet ist eine lichtempfindliche Verbindung, die in der Lage ist, bei Exposition gegenüber Licht chemisch reaktiv zu werden. Wenn Licht auf die photoprotektiven chemischen Gruppen angewendet wird, werden die Gruppen photoentschützt und sind gegenüber Wechselwirkungen mit chemischen Substanzen wie lichtemittierenden Verbindungen und Dämpfungsmitteln empfänglich.

[0439] Lokalisierte Bereiche des Mittels können auch dann noch hergestellt werden, wenn die photoprotektive chemische Gruppe die gesamte Oberfläche der Wand bedeckt. Das Licht kann selektiv auf Bereiche der Wand angewendet werden, bei denen es wünschenswert ist, das Mittel dort zu lokalisieren. Beispielsweise kann das Licht nur auf die Bereiche der Wand angewendet werden, die die Kanalöffnungen umgibt, so daß nur diese Bereiche photoentschützt werden. Wenn das Mittel zugegeben wird, wird es sich nur an der Wand um den Bereich herum, der die Kanalöffnungen umgibt, anheften.

[0440] Über das Verfahren zur Herstellung eines Wandmaterials mit einem lokalisierten Bereich der Lichtemission hinaus wird eine Oberfläche des Wandmaterials bereitgestellt. Eine lichtemittierende Verbindung wird auf die Oberfläche angewendet, um mindestens einen lokalisierten Bereich der Lichtemission auf der Oberfläche herzustellen. Die lichtemittierende Verbindung kann direkt auf die Oberfläche des Wandmaterials angebracht werden oder kann indirekt durch eine photoprotektive chemische Gruppe, die auf der Oberfläche angeheftet ist und durch Licht photoentschützt ist, auf der Oberfläche angeheftet werden.

[0441] Ein "lokalisierter Bereich der Lichtemission" wie hier verwendet ist ein Bereich konzentrierter lichtemittierender Verbindungen auf der Oberfläche des Wandmaterials, der eine Zielregion um einen Rand eines Kanals durch das Wandmaterial zur Detektion der Lichtemission definiert. Die lokalisierte Fläche kann auf verschiedene Weise hergestellt werden. Erstens kann die lichtemittierenden Verbindungen direkt an dem Wandmaterial nur um den Rand des Kanals herum angebracht sein. Zweitens kann eine lichtemittierende Verbindung an einer photoprotektiven chemischen Gruppe angebracht sein, die selektiv an lokalisierten Flächen um den Rand des Kanals angebracht wurde. Alternativ können die photoprotektiven chemischen Gruppen auf der gesamten Oberfläche oder auf zufallsverteilten Bereich der Oberfläche des Wandmaterials angebracht sein, wobei nur ausgewählte Bereiche durch Licht photoentschützt werden, um lokalisierte Bereiche zu erzeugen, an denen die lichtemittierende Verbindung angebracht werden kann. Sowohl die photoprotektiven chemischen Gruppen als auch die lichtemittierende Verbindung können zur gesamten Oberfläche oder zu zufallsverteilten Bereichen hinzugefügt werden, wenn eine Maske zur Erzeugung lokalisierter Bereiche der Lichtemission verwendet wird. Eine Maske, die Öffnungen aufweist, kann über dem Wandmaterial angebracht sein, so daß die Öffnungen in der Maske lokalisierte Bereiche der Wandmaterialoberfläche insbesondere um die Öffnungen der Kanäle herum exponieren.

[0442] Ein Wandmaterial mit lokalisierten Bereichen der Lichtemission auf einer Oberfläche des Wandmaterials kann auch hergestellt werden, indem zunächst eine lichtemittierende Verbindung auf der Oberfläche aufgebracht wird, um mindestens einen lokalisierten Bereich der Lichtemission auf der Oberfläche zu erzeugen, und anschließend ein Kanal in dem Wandmaterial erzeugt wird, wobei ein Rand des Kanals eine Zielregion innerhalb des lokalisierten Bereichs der Lichtemission bildet.

[0443] Ein nicht-beschränkendes Beispiele für ein Verfahren zur Herstellung eines Herstellungsartikels mit einem konzentrischen Ring von Donor-Fluorophoren um jeden Kanal herum wird bereitgestellt, um ein bevorzugtes erfindungsgemäßes Verfahren zu demonstrieren. Das Verfahren wird erreicht durch die Verwendung von photolabilen Schutzgruppen und Lichtbeugung. Auf einer Seite eines lichtundurchlässigen porösen Polycarbonat-Mediums wird eine dichte Schicht von kovalenten Linkern aufgebracht. Die Linker werden durch photolabile Schutzgruppen geschützt. Licht wird durch die Rückseite des lichtundurchlässigen Polycarbonats gesendet. Da die Wellenlänge der entschützenden Lichtquelle (400–500 nm) viel größer ist als die Größe des Kanals (5 nm), agiert jeder Kanal als eine Punktquelle für Licht. Die Intensität des entsendeten Lichts in der Nähe der Kanäle am größten. Entsprechend werden nur jene Gruppen in der Nähe des Kanals entschützt. Entschützte Gruppen sind frei, in nachfolgenden chemischen Reaktionen zur Erzeugung konzentrischer Ringe mit Donor-Fluorophoren zu reagieren.

[0444] Der Radius des konzentrischen Entschützungsring wird kontrolliert durch das Verständnis der Beugungsnatur des Lichts. Die lange Wellenlänge des Lichts und die geringe Größe der Kanäle bilden eine Zusammenstellung für sehr starke Beugung, wobei die Beugungswinkel größer sind als 90°. Licht tritt nicht durch die lichtundurchlässige Polycarbonatoberfläche, sondern wird gezwungen, eine Beugung durch die Kanäle durchzumachen. Nach dem Huygenschen Prinzip fungiert jeder Kanal als sekundäre Punktquelle für Licht, die kugelförmig abstrahlt. Huygens Prinzip besagt, daß alle Punkte auf einer Wellenfront als Punktquellen zur Erzeugung kugelförmiger sekundärer Elementarwellen angesehen werden können. Nach einer Zeit t wird die neue Position der Wellenfront die Einhüllende dieser sekundären Elementarwellen sein. Eine unmittelbare Folge aus dem Huygenschen Prinzip ist die Erzeugung von sekundären Punktquellen an den Kanalenden. Eine weitere Konsequenz ist, daß die Intensität des Anregungslichts mit zunehmender Distanz vom Zentrum jedes Kanals abnimmt.

[0445] Die den Kanal verlassende Menge Licht und die resultierende kugelförmige Ausbreitung der Lichtintensität kann berechnet werden. Die Energie des den Kanal verlassenden Lichts ist gegeben als die Querschnittsfläche des Kanals multipliziert mit der Intensität des einfallenden Lichts (I_0).

$$P = I_0 \pi R_{\text{kanal}}^2$$

[0446] Beim Verlassen des Kanals wird das Licht zu einer kugelförmig abstrahlenden Punktquelle. In diesem

besonderen Fall ist die Lichtquelle darauf beschränkt, in einem Halbkreis abzustrahlen (eine Oberfläche von $4\pi r^2/2$). Die neuen Intensitäten ($I(r)$) als Funktion des radialen Abstands vom Zentrum des Kanals ist gegeben als Energie des die Kanäle verlassenden Lichts geteilt durch die Strahlungs-Oberfläche an einem gegebenen Abstand (r).

$$I = \frac{P}{A} = \frac{I_0 R_{\text{Kanal}}^2}{2r}$$

[0447] Für eine 60W-Lichtquelle, die sich 1 cm von der Rückseite des lichtundurchlässigen Polycarbonats befindet, nimmt die Intensität bei einem Abstand von 35 nm (R_{gleich}) vom Zentrum des Kanals von $4,77 \text{ W/cm}^2$ auf $0,43 \text{ W/cm}^2$ ab, was einer Intensitätsänderung von 91% entspricht. Mit Hilfe der obigen Gleichung kann der Radius des Lichts um jeden Kanal durch die Intensität der Lichtquelle präzise kontrolliert werden.

[0448] Photosensitive Schutzgruppen sind in großer Ausführlichkeit beschrieben worden (Pillai, 1980). Abhängig vom Typ des kovalenten Linkers (Amin, Hydroxyl, Carboxylsäure, Keton, Sulfhydryl etc.) ist die entsprechende photosensitive Schutzgruppe erhältlich. Beispielsweise können Aminogruppen mit Nitroveratryloxycarbonyl (NVO), 2-Nitrobenzyloxycarbonyl und α -substituierten 2-Nitrobenzyloxycarbonyl-Gruppen geschützt werden. Die letzteren können auch zum Schutz von Carboxylsäuren und Hydroxylgruppen verwendet werden. Die photolytische Entblockierung von 2-Nitrobenzyloxycarbonyl-Derivativen ist unkompliziert und verlangt nur eine 350-nm-Lampe und Ethanol. Die Zeit für die Entschützung wird von 1–24 eingestellt.

[0449] Die Erfindung umfaßt auch eine Vorrichtung zur Detektion eines Signals. Die Vorrichtung stellt einen Träger für einen Herstellungsartikel und einen Sensor zur Detektion des Signals bereit, das durch die Wechselwirkung erzeugt wird, die auftritt, wenn das Polymer die Wechselwirkungsstation passiert. Die Vorrichtung beinhaltet ein Gehäuse mit Pufferkammer, eine Wand, die einen Teil der Pufferkammer bildet, und weist eine Mehrzahl von Öffnungen zur Ausrichtung von Polymeren auf sowie einen Sensor, der hinsichtlich des Gehäuses fixiert ist, wobei der Sensor die Signale, die an jeder Öffnung emittiert werden, von Signalen unterscheidet, die an den anderen Öffnungen emittiert werden, um öffnungsabhängige Sensorsignale zu erzeugen.

[0450] Ein "öffnungsabhängiges Sensorsignal" ist ein Signal, das an einer Öffnung in dem Wandmaterial als Folge einer Wechselwirkung zwischen einem Polymer und der Station entsteht.

[0451] Die Wand innerhalb des Gehäuses bildet mindestens eine und vorzugsweise zwei Pufferkammern. Eine "Pufferkammer" wie hier verwendet ist ein Bereich, der in der Lage ist, ein flüssiges Medium zu tragen. Die zwei Pufferkammern in einer Flüssiverbindung miteinander stehen.

[0452] Die Wand eine Mehrzahl von Öffnungen auf, die durch Kanäle innerhalb der Wand gebildet werden. Eine "Mehrzahl von Öffnungen" innerhalb der Wand bedeutet, daß mindestens zwei Öffnungen durch mindestens zwei Kanäle gebildet sind. Vorzugsweise besteht eine Mehrzahl von Öffnungen aus mindestens 50 Öffnungen.

[0453] Ein "Sensor" wie hier verwendet ist eine Vorrichtung, die auf einen physikalischen Reiz reagiert und resultierenden Impuls in Form eines Signals übermittelt. Sensoren beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf optische Sensoren, Temperatursensoren, Drucksensoren, Geräuschsensoren, Magnetsensoren, elektrische, mechanische, Radioaktivitäts- und Bewegungssensoren. Vorzugsweise ist der Sensor ein optischer Sensor. Ein "optischer Sensor" wie hier verwendet ist eine Vorrichtung, die aufgenommen elektromagnetische Strahlung detektiert und konvertiert und einen Impuls weiterleitet. Der Impuls kann gemessen und in Form von Daten gespeichert werden. Optische Sensoren sind im Stand der Technik gut bekannt und schließen Mikroskope ein. Der Sensor ist bezüglich des Gehäuses fixiert, so daß der Sensor in der Lage ist, Signale, die an der Wechselwirkungsstation erzeugt werden, zu detektieren. Es ist nicht erforderlich, daß der Sensor direkt an dem Gehäuse angebracht oder befestigt ist.

[0454] Ein Mikroprozessor wie hier verwendet ist eine Vorrichtung zur Erfassung und Speicherung von Sensorsignalen. Im allgemeinen ist ein Mikroprozessor ein Chip, der mehrere elektronische Komponenten wie ROM, RAM, Register und I/O-Controller enthält. Übliche Mikroprozessoren sind auf dem Gebiet der Elektronik gut bekannt.

[0455] Ein Beispiel für eine Vorrichtung, die ausgelegt ist, eine Nanokanal- (oder Mikrokanal-) Platte **120**, die in der Lage ist, ein elektrisches Feld zu erzeugen, ist in **Fig. 12** dargestellt. Das durch Elektroden **128**, **130** erzeugte elektrische Feld wird verwendet, um die DNA durch die Nanokanäle zu ziehen. Die beispielhaft Nano-

kanalplatte ist in eine leicht viskose Pufferlösung eingetaucht, die dazu beiträgt, den Durchgang des Polymers durch den Nanokanal zu verlangsamen, um so eine längere Signalerfassungszeit pro Base zu erreichen. Darüber hinaus befinden sich auf jeder Seite der Platte **128**, **130**, die in die Pufferlösung eingetaucht sind. Die Anordnung der Nanokanalplatte, Pufferkompartimente **122** und Elektroden ist in einer Kammer aus Glas optischer Qualität enthalten, die für die Bildanalyse geeignet ist, und sind zu einem 60x-, 1,4-NA-Öbektiv **126** benachbart angeordnet.

[0456] Wie oben beschrieben, bewirkt die Verwendung eines elektrischen Feldes, daß das Polymer bevorzugt linear durch einen Kanal wandert. Die Verwendung eines elektrischen Feldes ist geeignet, weil die gestreckte lineare Orientierung eines Polymers in einem elektrischen Feld vorteilhaft für die lineare Querung von Nanokanälen ist. Darüber hinaus kann die Bewegungsgeschwindigkeit des Polymers durch die Spannung kontrolliert werden. Schließlich beeinträchtigt ein elektrisches Feld nicht den FRET. Lichtmikroskopie (Bustamante, 1991; Gurrieri et al., 1990; Matsumoto et al., 1981, Rampino und Chrambach, 1990; Schwartz und Koval, 1989; Smith et al., 1989), Lineardichroismus (LD)(Akerman et al., 1990; Akerman et al., 1985, Moore et al., 1986), fluoreszenzdetektierter LD (Holzwarth et al., 1987), und lineare Doppelbrechung (Sturm und Weill, 1989; Chu et al., 1990) können verwendet werden, um die momentanen Änderungen in der Gestalt von DNA-Molekülen zu untersuchen, die einer Gelelektrophorese ausgesetzt werden. In diesen Untersuchungen ist gezeigt worden, daß DNA stark ausgerichtet und gestreckt wird.

[0457] Guirrieri et al., 1990, haben die lineare und gestreckte Konformation von DNA-Molekülen in einem elektrischen Feld demonstriert. In jedem der Fälle werden die DNA-Moleküle in Richtung des angelegten elektrischen Feldes ausgerichtet. Das zur Visualisierung der DNA-Moleküle verwendete Verfahren kombiniert Fluoreszenz-DNA-Markierung und die Verwendung eines Bildverstärker-Videokamera-Systems (Bustamante, 1991; Houseal et al., 1989; Morikawa und Yanagida, 1981; Matsumoto et al., 1989; Yanagida et al., 1983). Die dargestellten DNA-Moleküle sind T2-Moleküle, die eine Länge von 164 kbp aufweisen.

[0458] Die Ausrichtung von DNA in einem elektrischen Feld ist mit Hilfe von Lineardichroismus und Elektrodichroismus untersucht worden (Ding et al., 1972; Yamaoka und Charney, 1973; Colson et al., 1974; Hogan et al., 1978; Priore und Allen, 1979; Yamaoka und Matsuda, 1981; Wu et al., 1981). In der Tat sind die ersten Studien, die zur Ausrichtung von DNA durchgeführt wurden, mit diesen beiden Techniken vorgenommen worden. Die DNA wurde zunächst in Lösung untersucht und anschließend in Elektrophoresegele. Sowohl die für Lösungen als die für Gele vorgenommenen Untersuchungen ergaben ähnliche Ergebnisse, dahingehend, daß die DNA-Moleküle in der Tat in der Richtung des elektrischen Feldes ausgerichtet werden.

[0459] Native DNA zeigt einen negativen UV-Lineardichroismus (LD) als Folge der bevorzugt nahezu senkrechten Ausrichtung der Nukleotidbasen zu dem Feld. Die Orientierung von DNA ist auf die Anwesenheit entweder eines permanenten oder eines induzierten Dipolmoments zurückgeführt worden. Ding et al., 1972, beschreiben zum Beispiel ihre Beobachtung von DNA in einem Tris-Cacodylat-Puffer, verdünnt in Ethanol, um 80% v/v Ethanol zu erhalten.

[0460] LD-Daten von einzelnen elektrischen Pulsen von 9 V/cm. Die Dauer der Pulse ist durch den horizontalen Balken angegeben. Im Gleichgewicht ergibt sich ein LD^f-Plateau nahe -1,5, was bedeutet, daß die DNA in Richtung des elektrischen Feldes ausgerichtet ist (Akerman et al., 1990).

[0461] Akerman et al., 1990, haben LD-Untersuchungen über Puls-Gelelektrophorese vorgenommen und ähnliche Ergebnisse wie in Lösung erhalten. Akerman stellt eine Auftragung des LD^f gegen die Zeit bereit. LD^f repräsentiert die Orientierung im elektrischen Feld. Ein Wert von -1,5 bedeutet, daß das DNA-Molekül in dem elektrischen Feld ausgerichtet ist. Ein waagerechter Balken auf der x-Achse gibt die Dauer des elektrischen Pulses an. Die DNA liegt in 1% Agarose vor. Kurze Zeit nach dem Einsetzen der Pulse bildet die Kurve ein Plateau bei einem LD^f nahe -1,5, was bedeutet, daß die DNA kurze Zeit nach Einsetzen der Pulse ausgerichtet ist. Wenn der Puls abgeschaltet wird, richtet sich die DNA nicht mehr selbst in dem Feld aus und die LD^f-Kurve verbleibt nicht länger bei -1,5.

[0462] Das Grundprinzip der DNA-Orientierung im elektrischen Feld beruht entweder auf einem permanenten oder einem induzierten Dipolmoment in der DNA. Es sei daran erinnert, daß Dipole sich selbständig in der Richtung von elektrischen Feldern ausrichten, um das Drehmoment zu minimieren. Hogan et al., 1978, haben ein Grundprinzip für die Induktion eines Dipolmoments in DNA vorgeschlagen, das einen anisotropen Ionenstrom betrifft:

[0463] Um die Abhängigkeit der Dichroismus vom elektrischen Feld, der Ionenstärke des Mediums und der

Länge des Makromoleküls zu erklären, schlagen wir ein neues Modell vor, bei dem ein anisotroper Ionenstrom eine asymmetrische Ionenatmosphäre um das Polyelektrolyt erzeugt, was zu einem ausrichtenden Drehmoment führt.

[0464] Die Schlußfolgerung aus der Diskussion über die DNA-Ausrichtung in elektrischen Feldern ist, daß DNA-Moleküle und andere Polymere sich selbst in der Richtung von elektrischen Feldern ausrichten, ob in Elektrophoresegelelen oder in Lösung. Lösungsstudien wurden vor Elektrophoresestudien durchgeführt. Die Implikationen der DNA-Ausrichtung in einem elektrischen Feld stützen darüber hinaus die Tatsache, daß DNA-Moleküle und andere Polymere in einer linearen Weise durch Nanokanäle gelenkt werden können. Die ungefaltete Orientierung der DNA ist ebenfalls von Bedeutung für die lineare Querung von DNA-Molekülen. Wie oben beschrieben, können DNA und andere polymere Moleküle mit einem elektrischen Feld in linearer Weise durch Proteinkanäle gelenkt werden. Die hier beschriebenen Daten begründen dies weiter und geben eine theoretische Grundlage, warum DNA-Moleküle sich in dieser Weise verhalten können. Angesichts der Tatsache, daß gezeigt werden konnte, daß DNA durch Proteinporen in einer linearen Weise durchtritt, und daß DNA-Moleküle sich selbst in Richtung von elektrischen Feldern ausrichten, kann eine lineare Querung von DNA durch Nanokanäle erreicht werden.

[0465] Die Geschwindigkeit, in der ein Polymer sich bewegt, ist ebenfalls bedeutsam, weil die Dauer des Energietransfers wichtig ist. Je länger eine Akzeptor in der Donor-Fluorophor-Schicht verweilt, desto größer ist das erzeugte Signal. Integrationszeiten im Millisekundenbereich ermöglichen eine eindeutige Signaldetektion. Da die Schicht der Donor-Fluorophore ungefähr 40 Å beträgt, kann die erforderliche Geschwindigkeit der Polymer mit 40 Å/10 ms oder 4000 Å/s geschätzt werden. Bei der Nanokanal-FRET-Sequenzierung wird die vorgeschlagene Geschwindigkeit dadurch erreicht, daß entweder die Spannung des angelegten elektrischen Feldes oder der Friktionskoeffizient des Polymer-Moleküls kontrolliert werden.

[0466] Die Geschwindigkeit der DNA-Bewegung kann mit Hilfe der Gleichung, die die Bewegung eines DNA-Strangs in einem elektrischen Feld beschreibt (Tinoco et al., 1995), bestimmt werden:

$$u = ZeE/f,$$

wobei Z die (einheitslose) Zahl von Ladungen ist, $e = 1,6022 \times 10^{19}$ Coulomb, E das elektrische Feld in Volt pro Meter und F der Friktionskoeffizient in kg/s ist. Die Geschwindigkeit der Bewegung hängt von der Stärke des elektrischen Feldes, der Nettoladung des Moleküls sowie der Größe und Gestalt des Moleküls, charakterisiert durch seinen Friktionskoeffizienten, ab. Die Nettoladung des Moleküls wird durch Ze wiedergegeben. Der Friktionskoeffizient kann nach der folgenden Gleichung (Tinoco et al., 1995) bestimmt werden:

$$f = kf_0 = k(6\pi\eta r)$$

wobei η der Viskositätskoeffizient ist, r der Radius einer Kugel mit dem gleichen Volumen wie die DNA ist, k der Formfaktor (der für einen DNA-Strang ungefähr 1,7 beträgt) ist und f_0 der Friktionskoeffizient für eine Kugel mit demselben Volumen wie die DNA ist.

[0467] Es ist ersichtlich, daß entweder der Friktionskoeffizient oder die Stärke des elektrischen Feldes zur Kontrolle der Polymerbewegungsgeschwindigkeit verwendet werden kann. Für verschiedene Spannungen in einem gegebenen System existieren verschiedene Polymer-Migrationsraten. In entsprechender Weise weisen größere Moleküle oder Moleküle in viskoserem Medien eine langsamere Molekülbewegung auf. Aus Beispielen für die Gelelektrophorese sind Berechnungen der Wirkungen der elektrischen Feldstärke, der Polymergröße und des Friktionskoeffizienten möglich. Es ist wichtig, zu verstehen, daß eine viskose Medium den gleichen gewünschten Effekt auf den Friktionskoeffizienten erzielen kann wie ein Gel. Da der Friktionskoeffizient umgekehrt proportional zur Elektrophoresegeschwindigkeit ist, vermindert eine verdoppelte Viskosität die Elektrophoresegeschwindigkeit um das Zweifache.

[0468] Elektrophorese in viskosen Lösungsmitteln ist von einer Anzahl von Gruppen durchgeführt worden (Chang und Yeung, 1995; Bello et al., 1994; Jumppanen und Riekkola, 1995; Sahota und Khaledi, 1994; Klenchin et al., 1991; Harris und Kell, 1985; Korchemnaya et al., 1978). Sahota und Khaledi, 1994, zeigen Elektrophorese in Formamid, das bei 25°C eine Viskosität von 3,3 cP aufweist, was dem Dreifachen von Wasser (0,89 cP, 25°C) entspricht. Elektrophorese in Formamid ist vorteilhafter als in Wasser, da Formamid eine höhere Dielektrizitätskonstante als Wasser besitzt und viele geeignete Elektrolyte löst. Es wird üblicherweise in Mischung mit Wasser in Elektrophoresepuffern verwendet. Gemischte Glycerinlösungen, N-Methyl-2-pyrrolidon, Essigsäure und N-Methylformamid sind ebenfalls eingesetzt worden (Korchemnaya et al., 1978). Ein breiter

Bereich von Viskositäten ist möglich, und reicht von 1 cP bis zu 25 cP (Bellow et al., 1994). Die tatsächlich benötigte Viskosität hängt vom Friktionskoeffizienten der Polymermoleküle in den Nanokanälen ab. Der Netto-Friktionskoeffizient hängt daher von der Viskosität und auch den Friktionswirkungen des Nanokanals auf das Polymer ab. Aus der schmalen Bohrung des Nanokanals ergeben sich Reibungseffekte durch das Lösungsmittel-"Trapping" zwischen den Wänden des Nanokanals und dem markierten Polymer. Die Größenordnung dieses Lösungsmittel-"Trapping"-Effektes entspricht dem, der bei Gelelektrophorese entsteht. Im Ergebnis mag nur eine leicht viskose Lösung die gewünschte Polymergeschwindigkeit verbessern.

[0469] Für ein gegebenes elektrisches Feld kann die Elektrophoresemobilität für Moleküle unterschiedlicher Größe bestimmt werden, wenn das Verhältnis zwischen dem Molekulargewicht und der zurückgelegten Distanz bekannt ist:

$$\log M = a - bx$$

wobei M das Molekulargewicht der Nukleinsäure ist und x die zurückgelegte Strecke (proportional zur Mobilität) ist. a und b sind Konstanten für eine gegebenes elektrisches Feld.

[0470] Zusammenfassen kann gesagt werden, daß die Geschwindigkeit der Polymerbewegung in einem elektrischen Feld durch das elektrische Feld, den Friktionskoeffizienten und die Molekülgröße kontrolliert werden kann. Die gewünschten Werte für die Geschwindigkeit der Polymerbewegung sind leicht erhältlich.

[0471] Es gibt keine nachteiligen Wirkungen eines elektrischen Feldes auf den FRET. Da der Energietransfer kurzzeitige elektrische Dipolwechselwirkungen betrifft, kann die Anwesenheit eines äußeren elektrischen Feldes die Fähigkeit von Donor-Akzeptor-Paaren beeinträchtigen, einen FRET durchzumachen. Die Anwesenheit eines externen elektrischen Feldes hat keine nachteiligen Wirkungen auf den FRET, wie durch kürzliche Untersuchungen gezeigt wurde, die mit FRET-Primern und gelbasiertes automatischer DNA-Sequenzierung durchgeführt wurden (Glazer und Mathies, 1997; Hung et al., 1996; Ju et al., 1996a; Ju et al., 1996b; Marra et al., 1996; Wang et al., 1996; Wang et al., 1995). FRET-Primer werden verwendet bei der Markierung von Sequenzierungsreaktionsprodukten aufgrund der großen Stokes-Verschiebung und der daraus sich ergebenden besseren Fluorophor-Unterscheidung. Bei diesen Experimenten werden die FRET-markierten DNA-Fragmente auf einem Gel laufengelassen und gleichzeitig werden die Fragmente in Anwesenheit eines elektrischen Feldes mit einer CCD-Kamera und einem Laser detektiert. Es wird entweder ein Vierfarb-Kapillarelektrophorese-system oder ein Applied-Biosystems-373A-Sequenzierer verwendet. Diese Experimente zeigen, daß ein Energietransfer in Gegenwart eines starken elektrischen Feldes auftritt.

[0472] Ein Beispiel für eine Ausgestaltung einer Nanokanal-Vorrichtung ist in **Fig. 13** dargestellt, die aus zwei verschmolzenen Pyrex-Zellen **132**, **134** besteht, die die Nanokanalplatte **140** halten. Die oberen **136** und unteren **138** Pufferbereiche sind in der kleineren **134** bzw. größeren **132** Pyrexzelle enthalten. Die Pufferbereiche sind mit Deckgläsern **146** abgedichtet, die mit Indiumzinnoxid (ITO) modifiziert wurden. Indiumzinnoxid ist ein eindeutiger Leiter, der in diesem System als Elektroden **142** fungiert. Die Elektroden führen zu einer variablen Spannungsquelle **152**, die aus einem Lastwiderstand R_1 (einer für mehrere G, um ein System mit konstantem Strom zu erreichen) und eine rheostatkontrollierte Spannung aus einer Spannungsquelle besteht. Ein Voltmeter ist parallel angeschlossen. Unter dem Deckglas ist ein mit Öl **144** beschichtetes Immersionsobjektiv **150** angeordnet, um Fluoreszenzsignale **148** zu detektieren.

[0473] Das Polymer wird in dem oberen Puffer-Bereich aufgegeben und das elektrische Feld wird verwendet, um das Polymer zu der unteren Kammer zu lenken. Der Puffer weist die gewünschten Viskositäts- und Elektrolyseeigenschaften auf. Epiillumination und die Signalerfassung sind durch dasselbe 60x-, 1.4-NA-Ölimmersionsobjektiv möglich. Die Abmessungen der Vorrichtung entsprechen denen eines gewöhnlichen Mikroskop-Objekträgers (75 mm × 25 mm), um den Aufbau zu erleichtern. Die Lücke zwischen der Nanokanalplatte und dem Deckglas beträgt 0,4 mm. Ein dünnes Deckglas mit einer Dicke von 0,1 mm ist dargestellt. Diese Abmessungen sind bevorzugt, da Objektive einem großen Arbeitsabstand erhältlich sind. Beispielsweise besitzt das CFI₆₀-System von Nikon 60x-, 1.4-NA-Objektive, die Proben über eine Dicken von 0,6 mm untersuchen können.

[0474] Ein Temperaturkontrollblock wird verwendet, um eine Joule-Erwärmung und Temperaturschwankungen zu verhindern. Der Block kann die Nanokanalvorrichtung umgeben und weist Eingangs-/Ausgangs-Anschlüsse für einen Kühlmittelstrom auf. Der Block ist hohl, um eine einheitliche Temperaturkontrolle der Nanokanal-Vorrichtung zu ermöglichen. Es existieren Eingangs-/Ausgangs-Anschlüsse auf beiden Seiten der Vorrichtung, die einen Kreislauf des Kühlmittels durch die hohle Kammer ermöglichen.

[0475] Mehrere Gruppen haben spezialisierte Vorrichtung für Fluoreszenzmikroskopiebeobachtungen der Elektrophorese verwendet (Rampino und Chrambach, 1991; Matsumoto et al., 1981; Smith et al., 1989; Bus-tamante, 1991; Gurrieri et al., 1990; Schwartz und Koval, 1989; Smith et al., 1990). Die von Smith et al., 1990, für die Beobachtung von DNA-Molekülen, die einer Pulsfeldgelelektrophorese unterzogen wurden, verwendete Vorrichtung ist beschrieben:

[0476] Ein 20- μ l-Tropfen geschmolzene Agarose wurde zwischen zwei Mikroskop-Deckgläsern (24 mm \times 24 mm) plaziert und für 10 Minuten abgekühlt. Die Sandwich-Anordnung wurde auf einem normalen Mikroskop-Objektträger plaziert und an den vier Ecken mit Fingernagellack abgedichtet. Der Objektträger wurden vorher mit vier Kupferelektroden ausgestattet, mit Epoxidkleber fixiert wurden. Diese Vorrichtung wurde dann für etwa 30 Minuten auf etwa 5°C abgekühlt. Anschließend wurde geschmolzene Agarose auf die Elektroden getropft, um die elektrische Verbindung zu vervollständigen, und TBE-Puffer (5 \times) wurde gelegentlich zugegeben, um es feucht zu halten.

[0477] Rampino und Chrambach, 1991, beschreiben eine komplexere Vorrichtung, die größere Pufferbereiche, Elektroden aus Platinstreifen und einen Bereich für den Kühlmittelfluß aufweist. Die gesamte Vorrichtung kann auf dem Mikroskopisch montiert werden. Das tatsächliche Gel selbst ist zwischen zwei Deckgläsern angeordnet und im Zentrum der Apparatur in Kontakt mit Pufferblöcken auf beiden Seiten plaziert. Die Gestaltung ermöglicht eine homogenes elektrisches Feld und eine Temperaturkontrolle. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Vorrichtung ist die Vorrichtung von Rampino and Chrambach für Standard- und nicht für Pulsfeldgelelektrophorese ausgelegt.

[0478] Wie die erfindungsgemäße Vorrichtung (dargestellt in **Fig. 13**) im Verhältnis zu einem Polymer funktioniert, wird unten beschrieben. Ein Polymer, wie eine DNA, wird durch die erfindungsgemäßen Verfahren oder irgendein anderes im Stand der Techni bekanntes Verfahren markiert (intrinsisch oder extrinsisch). Die markierte DNA wird eine Pufferlösung gegeben, die vorzugsweise leicht viskos ist. Der Puffer wird in die obere Pufferkammer **136** gegeben. Ein elektrisches Feld wird unter Einsatz der Elektroden erzeugt und die DNA wird dazu gebracht, in die Nanokanäle der Nanokanalplatte **140** in linearer Weise einzutreten. Sobald die markierte DNA auf der anderen Seite der Nanokanalplatte austritt, wird der Marker dazu gebracht, mit einem Mittel oder der Umgebung, die den Kanal umgibt, zu wechselwirken, um ein Signal oder einen polymerabhängigen Impuls zu erzeugen, der durch die Detektionseinrichtung detektiert werden kann. Das detektierte Signal oder der polymerabhängige Impuls werden gespeichert und verarbeitet, um Strukturinformationen über das Polymer zu gewinnen.

[0479] Ein abschließender Aspekt der Erfindung umfaßt ein Verfahren zur Herstellung von Nukleinsäuren zur Verwendung gemäß den Verfahren der Erfindung sowie für jede andere Verwendung, bei der es wünschenswert ist, zufallsmarkierte Nukleinsäuren zu verwenden. Das Verfahren beinhaltet die Schritte des Inkontaktbringens einer sich teilenden Zelle mit einem Nukleotidanalogen, Isolierens von Nukleinsäuren aus der Zelle, die das Nukleotidanalogen aufgenommen hat, und Modifizierens der Nukleinsäure mit eingebautem Nukleotidanalogen durch Markieren des eingebauten Nukleotidanalogs. Ein "Nukleotidanalogs" wie hier verwendet ist ein Molekül, das für A, T, G oder C eingebaut werden kann, das jedoch eine andere Struktur aufweist. Nukleotidanaloga beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf ein bromiertes Analogon, 2,4-Dithiouracil, 2,4-Diiselenouracil, Hypoxanthin, Mercaptopurin, 2-Aminopurin und Selenopurin. Die eingebauten Nukleotidanaloga können mit einem Mittel markiert sein, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einer lichtemittierenden Verbindung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle.

[0480] Eine sich teilende Zelle wird mit einem Nukleotidanalogen durch jedes im Stand der Technik für den Einbau von Nukleotiden in lebende Zellen bekannte Mittel "in Kontakt gebracht". Das Nukleotidanalogen kann beispielsweise zum Zellkulturmedium zugegeben werden und auf natürlichem Weg durch die Zellen aufgenommen werden. Um die Aufnahme des Nukleotidanalogs zu optimieren, kann das Wachstum der sich teilenden Zellen unter Anwendung konventioneller Mittel vor der Zugabe des Nukleotidanalogs zu dem Mittel angehalten werden, und anschließend kann die Arretierung rückgängig gemacht werden, um es den Zellen zu ermöglichen, erneut in den Zellteilungszyklus einzutreten, sobald das Nukleotidanalogen zu dem Medium zugegeben ist. Die Nukleinsäuren, die das Nukleotidanalogen eingebaut haben, können dann isoliert werden, nachdem in mindestens einen Zellteilungszyklus wieder eingetreten sind und diesen vervollständigt haben.

[0481] Ein Beispiel für ein Verfahren zum Einbau eines Nukleotidanalogs in DNA wird in Bick und Davidson, Proc. Nat. Acad. Sci., 71: 2082–2086 (1974) gegeben. Bick und Davidson haben die BrdU-abhängige Zelllinie B4 in einem basalen Wachstumsmedium von Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium, versetzt mit 10% fötalem Kälberserum (E-Medium), enthaltend 0,1 mM BrdU, angezogen. 100-mm-Falcon-Kunststoff-Gewebekul-

turschalen wurden mit 10^6 B4-Zellen in E-Medium, enthaltend 0,1 mM Hypoxanthine, 0,4 μ M Aminopterin und 10 μ M BrdU (E-HAB-Medium) angeimpft und die Zellen wurden drei Mal in hoher Dicht (5×10^5 Zellen je 100-mm-Schale) in E-HAB-Medium über sechs Wochen übertragen. Die Zellen wurden dann in geringer Dichte (1000 Zellen pro 6-mm-Schale) in E-HAB-Medium ausplattiert und drei Wochen später wurden ungefähr 10 große Kolonien auf jeder Platte beobachtet. Die Zellen von einer Schale wurden geerntet und als neue Zelllinie mit der Bezeichnung HAB gehalten. Aufgrund der erwarteten Because of the expected Photosensibilität der BrdU-haltigen Zellen wurden die HAB-Zellen jederzeit vor dem Umgebungslicht geschützt. Nach 100 Zellgenerationen in E-HAB-Medium wurde eine Teilmenge von HAB-Zellen auf E-Medium zurückübertragen. Eine neue Unterlinie ist. Die Nukleinsäuren, die das Nukleotidanalogen eingebaut haben, können dann isoliert werden, nachdem in mindestens einen Zellteilungszyklus wieder eingetreten sind und diesen vervollständigt haben.

[0482] Ein Beispiel für ein Verfahren zum Einbau eines Nukleotidanalogs in DNA wird in Bick und Davidson, Proc. Nat. Acad. Sci., 71: 2082–2086 (1974) gegeben. Bick und Davidson haben die BrdU-abhängige Zelllinie B4 in einem basalen Wachstumsmedium von Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium, versetzt mit 10% fötalem Kälberserum (E-Medium), enthaltend 0,1 mM BrdU, angezogen. 100-mm-Falcon-Kunststoff-Gewebekulturschalen wurden mit 10^6 B4-Zellen in E-Medium, enthaltend 0,1 mM Hypoxanthine, 0,4 μ M Aminopterin und 10 μ M BrdU (E-HAB-Medium) angeimpft und die Zellen wurden drei Mal in hoher Dicht (5×10^5 Zellen je 100-mm-Schale) in E-HAB-Medium über sechs Wochen übertragen. Die Zellen wurden dann in geringer Dichte (1000 Zellen pro 6-mm-Schale) in E-HAB-Medium ausplattiert und drei Wochen später wurden ungefähr 10 große Kolonien auf jeder Platte beobachtet. Die Zellen von einer Schale wurden geerntet und als neue Zelllinie mit der Bezeichnung HAB gehalten. Aufgrund der erwarteten Because of the expected Photosensibilität der BrdU-haltigen Zellen wurden die HAB-Zellen jederzeit vor dem Umgebungslicht geschützt. Nach 100 Zellgenerationen in E-HAB-Medium wurde eine Teilmenge von HAB-Zellen auf E-Medium zurückübertragen. Eine neue Unterlinie von Zellen, bezeichnet als HAB-E, wurde isoliert und in E-Medium gehalten.

[0483] Bick und Davidson zogen die Zellen in den (oben beschriebenen) Medien an, zu denen $H_3^{32}PO_4$ (New England Nuclear Corp.) in einer Aktivität von 2 μ Ci/ml zugegeben wurde. Nach 2–3 Populationsverdoppelungen wurden die Zellen geerntet und wie in Ein nicht beschränkend zu verstehendes Beispiel für ein IBRS-Schema ist detailliert im folgenden beschrieben. Das Verfahren ist in **Fig. 14** skizziert und umfaßt die Schritte von der anfänglichen DNA-Isolierung bis zur Genommarkierung und der abschließenden Sequenzanalyse. Die Zellen werden aus der Person isoliert und dann angezogen. Zu einer Zeit, wenn genügend Zellen zur Verfügung stehen, um genügend genetisches Material zur Verfügung zu stellen, werden die Zellen im Zellzyklus angehalten. Die Arretierung kann an jeder Stelle des Zyklus auftreten, solange sie nicht die S-Phase unterbricht. Nukleotidanaloga, die leicht chemisch derivatisiert werden können, wie beispielsweise 8-Brom-2'-Desoxypurine und 5-Brom-2'-Desoxypyrimidine werden zu dem Wachstumsmedium hinzugegeben. Die Zellen werden dann für einen Zyklus angezogen und die genomische DNA wird aus den Zellen isoliert. Die erhaltene DNA ist eine Chimäre aus markierter und unmarkierter DNA, eine Folge der semikonservativen Replikation. Der Vorteil, eine DNA zu haben, die nur an einem Strang markiert ist, besteht darin, daß die resultierende Duplex-DNA in den erfindungsgemäßen Sequenzierungsverfahren verwendet werden kann.

[0484] Die genomische DNA wird zu Größen von ungefähr 100 kb aufgebrochen. Die genomische DNA wird chemisch markiert und an dieser Stelle endmarkiert. Der Vorteil einer Kultivierung der Zellen in bromierten Analoga besteht darin, daß solche eine Modifikation die Basen für eine weiter Modifikation aktiviert, die Zugabe von Akzeptor-Markern zu den Basen. Für ein menschliches Genom ergeben sich ungefähr dreißigtausend Fragmente. Die Fragmente werden gleichzeitig durch die erfindungsgemäßen Sequenzierungsverfahren analysiert. Fragmente ähnlicher Größe und potentielle Sequenzen werden zusammengefaßt und Populationsanalysen werden durchgeführt, um DNA-Sequenzinformationen zu erzeugen. Die Sequenzierung eines Genoms kann in ungefähr sechs Stunden vervollständigt werden. Die Zeit von der Isolierung aus der Zelle einer Person bis zum Ende der Sequenzierung beträgt ungefähr eine Woche. Die folgenden Abschnitte beschreiben jeden einzelnen Schritt im Detail.

[0485] Der erste Schritt bei dem dargestellten Schema ist die Zellkultur und die Zellzyklusarretierung. Der Zweck der Zellzyklusarretierung besteht darin, eine synchrone Population von Zellen zu erzeugen, die zur selben Zeit eine DNA-Replikation durchmachen, um sicherzustellen, daß die erhaltene DNA eine Chimäre aus markierter und unmarkierter DNA sein wird. Es gibt viele Verfahren zur Synchronisierung von Zellen, einschließlich Verfahren, die Zellen entweder in der M- oder S-Phase arretieren. Nur eine M-Phasen-Blockierung würde die gewünschten genomischen Chimäre erzeugen. Beispiele für Metaphase-Inhibitoren beinhalten Distickstoffoxid unter Druck, Vinblastin (Marcus & Robbins, 1963), und Colcemid. Colcemid blockiert Zellen in der Metaphase, kann jedoch durch Waschung rückgängig gemacht werden (Mithison, 1971; Kato & Yoshida,

1970; Stubblefield, 1968). Die Zellen werden für wenige Stunden in Colcemid angezogen, was zu einer synchronen Kultur führt (Wunderlich & Peyk, 1969). Distickstoffoxid unter Druck (Rao, 1968) ist dadurch, daß es leicht entfernt werden kann, vorteilhaft. Die Entfernung der Blockade und die Zugabe des gewünschten bromierten Basenanalogs ermöglicht den gleichzeitigen Eintritt in die S-Phase.

[0486] Die Nukleotidanaloga, die verwendet werden können, beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf 8-Brom-2'-desoxyadenosin, 8-Brom-2'-desoxyguanosin, 5-Brom-2'-desoxycytidin und 5-Brom-2'-Desoxyuridin. Diese bromierten Nukleotidanaloga werden für die Kopplung an Nukleophile aktiviert (Traincard et al., 1983; Sakamoto et al., 1987; Keller et al., 1988; Hermanson, 1996). Die Kopplung von aminhaltigen Akzeptor-Markern und Fluorophoren mit den Basenanaloga wird bei Raumtemperaturen (35°C) durchgeführt. Die endgültigen Positionen der Akzeptor-Marker sind so, daß die Basenpaarung des markierten Fragments nicht beeinträchtigt ist.

[0487] Bromierte Nukleotidanaloga sind kommerziell erhältlich (Sigma Corp., Fluka Inc., Fisher Scientific, Inc.) oder können durch Reaktion mit bromierenden Reagenzien hergestellt werden. Hermanson, 1996, skizziert ein Protokoll zur Bromierung von DNA an Thyminen, Cytidinen und Guanosinen unter Verwendung von N-Bromosuccinimid (NBS). Adenin-Reste werden durch andere Verfahren hergestellt, die kein NBS erfordern. Beispielsweise können 8-Bromo-2'-desoxyadenosin und 8-Bromo-2'-desoxyguanosin durch Reaktion der nativen Base mit Bromwasser synthetisiert werden (Ikehara et al., 1969a; Ueda et al., 1974; Faerber & Scheit, 1971; Kochetkov et al., 1968). Die Bromierung an Position 8 der Purine kann auch mittels des Nukleotidmorpholidats erreicht werden (Lang et al., 1968; Ikehara et al., 1969b). Die Lösungsmittelbeschaffenheit ist für die Bromierung besonders wichtig. Die Bromierung von 2'-desoxyadenosin in Dimethylformamid bei 0°C nicht statt, wenn die Reaktion jedoch bei 50–60°C in Eisessig durchgeführt wird, wird 8-Bromo-2'-desoxyadenosin relativ leicht gebildet (Guéron et al., 1967; Rahn et al., 1965).

[0488] Von bromierten und anderen Basenanaloga ist gezeigt worden, daß sie bei der Zellkultur effizient in genomische DNA eingebaut werden (Balzarini et al., 1984). Ein besonderes Beispiel ist der Einbau von 5-Brom-2'-desoxyuridin in Zellen, die für die Durchflußzytometrie eingesetzt werden. 5-Brom-2'-desoxyuridin wird anstelle von Thymidin in neu synthetisierte DNA eingebaut (Crissman et al., 1990; Poot & Hoehn, 1990; Böhmer, 1990; Gaines et al., 1996; Nicolas et al., 1990). Der Prozentanteil der Substitution durch das Basenalogon kann sehr hoch sein, nach Bick und Davidson, 1974, in ihrer oben beschriebenen Veröffentlichung mit dem Titel "Total Substitution of Bromodeoxyuridine for Thymidine in the DNA of a Bromodeoxyuridine-Dependent Cell Line". Im folgenden wird ein Abschnitt aus dieser Veröffentlichung wiedergegeben:

[0489] Um eine vollständige Substitution zu erreichen, wurden BrdU-abhängige Zellen einem Kulturmedium, das Aminopterin, ein starker Inhibitor der Thymidin-Biosynthese, und BrdU enthielt, in Abwesenheit von Thymidin ausgesetzt ... Wir berichten hier über die Isolierung einer Zelllinie, bei der mindestens 99,8% des Thymidins in der Kern-DNA durch BrdU ersetzt wurden.

[0490] Bei dem vorliegend vorgeschlagenen Ein-Basen-Zufallsmarkierungsschema sind so hohe Prozentanteile wie 99,8% Substitution nicht erforderlich, solche Daten geben jedoch einen Einblick in die Möglichkeiten der Aufnahme von Basenanaloga durch Zellen. Andere bromierte Basenanaloga können entsprechend leicht in Säugetierzellen eingebaut werden (Stewart et al., 1968). Einige wenige Beispiele für Nicht-Brom-Basenanaloga, die auf diese Weise eingebaut wurden, schließen 2-Aminopurin (Glickman, 1985), 5-Propynoxy-2'-desoxyuridin und 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (Balzarini et al., 1984) ein.

[0491] Nach Erzeugung der in geeigneter Weise bromierten Chimäre durch die Zellkultur wird die chimäre genomische DNA durch Durchführung verschiedener Schritte, einschließlich eines optionalen Schritts der Chromosomensortierung, vorbereitet. 100-kb-DNA-Fragmente können aus dem teilweisen Verdau von durchflußsortierten Chromosomen erzeugt werden. Der optionale Durchfluß-Sortierungsschritt ist detailliert in vielen Handbüchern und Lehrbüchern abgehandelt worden (de Jong et al., 1989; Fawcett et al., 1994) und wird hier nicht im Detail beschrieben. Kurz gesagt, werden die Zellen durch Zugabe von Colcemid in der Metaphase arretiert. Mehrere Millionen kultivierte Zellen werden sanft lysiert, um die Metaphase-Chromosomen in einen Suspensionspuffer freizusetzen, in dem sie mit einem oder mehreren fluoreszierenden Farbstoffen markiert werden. Die Ziel-Chromosomen werden dann unter Verwendung entweder eines einzigen Fluorophors in einem Ein-Laser-System oder von zwei Fluorophoren in einem Zwei-Laser-Detektionssystem durch ihr Fluoreszenzemissionsmuster identifiziert. Die sortierten Chromosomen werden dann präpariert und teilweise nach dem von Glover und Hames, 1995, in DNA Cloning 3, beschriebenen Verfahren verdaut. Größen in der Größenordnung von 100 kb werden erhalten.

[0492] Die Fluorophor-Markierung der bromierten DNA kann entweder vor oder nach dem Teilverdau vorgenommen werden. Die Basen-Bromierung aktiviert die Basen für die nukleophile Verdrängung. Viele verschiedenen Fluorophore mit Amin-/Hydrazin-Gruppen können verwendet werden, einschließlich den bekannten Farbstoffen Fluoreszein, Cumarin, Eosin, Rhodamin und Texasrot (Molecular Probes, OR). Diese weisen Absorptionen und Emissionen im sichtbaren Bereich auf. Die Aminogruppe auf diesen Fluorophoren attackiert die Position 8 der Purine und die Position 5 der Pyrimidine, die einer nukleophilen Verdrängungsreaktion unterliegen. Das Versuchsprotokoll für die Verdrängungsreaktion wird von Hermanson, 1996, beschrieben. Eine modifizierte Übersicht über das Markierungsschema ist unten dargestellt.

Protokoll zur Markierung bromierter DNA

1. Löse ein hydrazin- oder amingekoppeltes Fluorophor in Wasser zu einer Konzentration von 80–100 mM.
2. Füge 25 µl der Fluorophor-Lösung zu einer bromaktivierten DNA-Lösung hinzu.
3. Lasse für 1 h bei 50°C reagieren.
4. Reinige mittels Ethanol-fällung. Füge 20 µl 4 M LiCl und 500 µl Ethanol (gekühlt auf –20°C) hinzu. Mische sorgfältig.
5. Lagere für 30 min bei –20°C, dann trenne die ausgefällte DNA durch Zentrifugation bei 12.000 g ab.
6. Entferne den Überstand und wasche den Niederschlag mit 70% und 100% Ethanol, zentrifugiere nach jeder Waschung.

[0493] Löse den markierten DNA-Niederschlag erneut in Wasser auf und lagere bei –20°C.

[0494] Bei dem teilweisen Genomverdau werden ungefähr dreißigtausend 100-kb-Fragmente erzeugt. Die Fragmente werden entweder mit terminaler Transferase oder durch Ligation an kurze markierte Polynukleotide endmarkiert. Die Fluoreszenzmarker, die durch Endmarkierung eingebaut wurden, werden entweder durch unterschiedliche Absorptionsspektren oder eine spezifische Sequenz von Markern (wie in dem Ligations-Schema) identifiziert. Im Anschluß an die Endmarkierung wird die präparierte DNA der Nanokanal-FRET-Sequenzierung wie oben beschrieben unterzogen.

[0495] Die Daten werden nach der Fragmentgröße und der potentiellen Sequenz sortiert. Durch Populationsanalyse wird die DNA-Sequenz erzeugt.

[0496] **Fig. 15** stellt ein allgemeines Schema zu Entzifferung der DNA-Sequenz aus der IBSA-Markierung bereit. Eine Probe genomischer DNA weist zwei seiner Basen markiert auf (in diesem Fall A und C). Die endmarkierten und intern markierten DNA-Fragmente werden durch FRET-Sequenzierung analysiert. Die erhaltenen Daten werden nach Fragmentgröße und potentieller Sequenz sortiert. Potentielle Sequenz ist definiert als das Muster von sequenzspezifischen FRET-Signalen, das für ein bestimmtes DNA-Fragment erzeugt wird. Eine potentielle Sequenz ergibt keine Sequenzinformation, sondern ermöglicht eher die eindeutige Identifikation von DNA-Molekülen. Populationsanalysen werden durchgeführt, um alle Positionen der As und Cs auf jedem der Fragmente zu bestimmen. Komplementäre Stränge werden gepaart. Das Verfahren zur Bestimmung der Basenposition wird lediglich für eine der Basen (A) wiederholt. Der Vergleich der erhaltenen Daten für eine markierte Base und zwei markierte Basen erzeugt die DNA-Sequenz.

[0497] Hundertkilobasen-Fragmente sind für die Sequenzierung nicht in jedem Fall erwünscht. Die Expressionskartierung und Einzelgensequenzierung erfordern viel kürzere markierte Fragmente. Die Erzeugung von kürzeren markierten Fragmenten kann durch Nichtranslation, Primer-Extension und die Polymerasekettenreaktion (PCR) erreicht werden. Darüber hinaus können kleinere Fragmente auch durch eine Modifikation der Sanger-Reaktion und die Verwendung von terminalen Transferasen analysiert werden. Mit enzymatischen Verfahren können oftmals große Nukleotidanaloga eingebaut (Hermanson, 1996).

[0498] Bei der Primer-Extension werden modifizierte Nukleotid-Triphosphate zu einer DNA-Matrize unter Verwendung einer definierten Menge des gewünschten Primers zugegeben. Als Polymerase wird das Klenow-Fragment verwendet, dem die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der intakten E.-coli-DNA-Polymerase-I fehlt (Kessler et al., 1990; Feinberg und Vogelstein, 1983, 1984), Äquivalente Enzyme sind die Sequenase 2.0 und T7-Polymerasen. Dieses Verfahren ist ein einfaches Verfahren zur Herstellung intern markierter Ziel-DNA. Unter Verwendung dieser Verfahren ist die Synthese von großen intern markierten DNA-Fragmenten mit Längen von mehr als 10 Kilobasen synthetisiert worden, wobei eines der Nukleotide durch eine modifizierte Base ersetzt wurde. Eine kurze Zusammenfassung des Protokolls beinhaltet die Verwendung von Sequenase 2.0 (Amersham). Die Anlagerungs("Annealing")-Reaktion besteht aus 1 µl Primer (0,5 pmol/µl), 2 µl Sequenase-Puffer (5×), 5 µg Plasmid-DNA und 10 µl sterilem destilliertem Wasser. Nach Inkubation in einem Wasser-

bad bei 65°C für 2 Minuten wird die Anlagerung bei 30°C für 30 Minuten durchgeführt. Die jeweilige Reaktionsmischung besteht aus 10 µl Anlagerungs-Reaktion (Primer-Matrize), 1 µl Dithiothreitol (0,1 M), 1 µM von jedem dNTP, 0,1 µM eines Fluorophor-dNTPs und 0,025 U/µl Sequenase. Nach dem Mischen wird die Reaktion für 15 Minuten bei Raumtemperatur ermöglicht.

[0499] Unter Einsatz von Primer-Extension haben Ambrose et al. (1993) und Harding und Keller (1992) die Synthese von großen fluoreszierenden DNA-Molekülen demonstriert. In ihren Experimenten wurde in einer DNA, die länger als 7 kb war, eine vollständige Ersetzung eines Pyrimidins mit einem Fluorophor-Analogen erreicht. Von denselben Autoren ist auch über fluoreszierende DNA zwischen 5 bis 7 kb Länge berichtet worden, bei der zwei Pyrimidine vollständig markiert sind. Große Fragmente sind unter Verwendung anderer ungewöhnlicher Basenanaloga wie beispielsweise 7-(2-Oxoethyl)guanin, 2'-Amino-2'-desoxycytidin, 8-Oxopurin und N-4-aminodesoxycytidin ebenfalls synthetisiert worden have been synthesized as well Barbin et al., 1985; Purmal et al., 1994; Aurup et al., 1994; Negishi et al., 1988).

[0500] Die Nicktranslation nutzt die Fähigkeit von Escherichia-coli-DNA-Polymerase I, die sequentielle Addition von Nucleotidresten an das 3'-Hydroxyl-Ende eines "Nicks" [erzeugt durch Pankreas-Desoxyribonuclease (Dnase) I] mit der Eliminierung von Nucleotiden vom benachbarten 5'-Phosphoryl-Ende zu kombinieren (Meinkoth & Wahl, 1987; Rigby et al., 1977; Langer et al. 1981; Höltke et al., 1990). Viele modifizierte Basen sind durch Nicktranslation eingebaut worden (Meffert und Dose, 1988; Gebeyehu et al., 1987; Gillam und Tener, 1986). DNA-Polymerase I verursacht Brüche, die so schnell zu füllen sind, wie sie gebildet werden, wobei die gewünschten Nucleotide in den ursprünglichen Strang eingebaut werden. Da eine Menge von markierten Nucleosid-triphosphaten während der Reaktion anwesend ist, werden die Marker eingebaut und die Elternstränge werden modifiziert. Die Nicktranslation beinhaltet eine Mischung aus der doppelsträngigen Ziel-DNA, 1 µl DNase I bei einer Konzentration von 2 ng/ml, 1 µl der drei Arten von unmodifizierten Desoxynucleosid-Triphosphaten (dNTPs bei einer Konzentration von 100 µM), 1 µl eines markierten dNTPs (bei 300 µM), 32 µl Wasser und 1 µl DNA-Polymerase, enthaltend 5–10 Aktivitätseinheiten. Die Reaktion schreitet für 1 h bei 15°C fort. Die Reaktion wird durch 4 µl 0,25 M EDTA, 2 µl 10 mg/ml tRNA und 150 µl 10 mM Tris, pH 7,5, abgestoppt. Markierte DNA wird durch Ethanol-fällung gereinigt (Bethesda Research Laboratories, New England Nuclear, und Amersham).

[0501] Die direkte PCR-Markierung baut nicht nur die gewünschten DNA-Marker in die Ziel-DNA ein, sondern amplifiziert auch die Menge der markierten DNA (Saiki et al., 1985, 1988). Die PCR setzt die hitzestabile Form der DNA-Polymerase, üblicherweise die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, ein. Die Taq-Polymerase besitzt die Fähigkeit, bei jedem PCR-Zyklus Marker in wachsende DNA-Kopien einzubauen. Auf diese Weise können DNA-Fragmente bis zu 3 kb markiert werden. Wiemann et al., 1995, beschreiben das Verfahren zur internen Markierung von PCR-Produkten mit Fluoreszein-15-dATP, ein Protokoll, das auf andere Fluorophore anwendbar ist. Die Reaktionsmischung für den PCR-Einbau von Fluorophoren besteht aus 1 µM von jedem Primer, 200 µM von jedem dNTP, 10 µM eines Fluorophor-dNTPs und 0,025 U/µl Taq-Polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). Der Reaktionspuffer besteht aus 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ und 0,01 (Gew./Vol.) Gelatine. Die PCR wird über dreißig Zyklen durchgeführt.

[0502] Sequenzierungsreaktionen, die durch das Sanger-Verfahren erzeugt werden, können ebenfalls mit Hilfe enzymatischer Markierung analysiert werden. Jedes kettenterminierte Fragment wird mit einem 5'- und 3'-Fluorophor markiert.

[0503] Der 5'-Fluorophore wird als Teil des Primers eingebaut und die 3'-Endmarkierung wird durch terminale Transferase addiert. Terminale-Transferase-Markierung wurde ursprünglich unter Verwendung von radiomarkierten Nucleosid-Triphosphaten entwickelt (Roychoudhury et al., 1979; Tu und Cohen, 1980). Die Technik wurde später auf nicht-radioaktive Nucleotidanaloga angewendet (Kumar et al., 1988). Die Technik beinhaltet die Zugabe der Ziel-DNA zu (a) 20 µl 0,5 M Kalium-Cacodylat, 5 mM CoCl₂, 1 mM DTT, pH 7, (b) 100 µM eines modifizierten Desoxynucleosid-Triphosphats, 4 µl 5 mM dCTP und 100 µl Wasser. Die terminale Transferase wird in einer endgültigen Konzentration von 50 Einheiten zur Reaktionsmischung zugegeben und für 45 bei 37°C zur Reaktion gebracht (Hermanson, 1996).

[0504] Ein Nachmarkierungsverfahren kann ebenfalls verwendet werden. Bei diesem Verfahren wird zunächst unter Verwendung der oben beschriebenen Verfahren ein Basenanaloga mit einem Linkerarm zur Anbringung eines Fluorophors in die DNA eingebaut. Die anschließende Anbringung von Fluorophoren an dem Linkerarm ist unter Verwendung von kovalenten Verknüpfungsverfahren, wie sie beispielsweise von Waggoner (1995) beschrieben wurden, möglich. Jett et al. (1995) haben die Vollängen-Synthese von M13-DNA (7250 bp) gezeigt, bei vollständigem Einbau von einer der folgenden Verbindungen: 5-(3-Aminopropynyl)-dCTP,

5-(3-Aminoallyl)-dCTP oder 5-(3-Aminoallyl)dUTP. Die kovalente Anheftung von Fluorophoren an die Linker wurde ebenfalls gezeigt. Der Vorteil dieser Technik besteht darin, daß der Marker nicht aus einem einzelnen fluoreszierenden Molekül bestehen muß, sondern größere Moleküle mit größerer Zahl von Farbstoffen sein konnte. Solche Beispiele beinhalten Phycobiliproteine, farbstoffgefüllte Perlen, markierte Proteine oder Ketten aus Fluoreszenzmarkern.

1. Akerman, B., Jonsson, M., Moore, D. und Schellman, J. 1990. Conformational dynamics of DNA during gel electrophoresis studied by linear dichroism spectroscopy. In *Electrophoresis of Large DNA Molecules* (Lai, E. und Bitten, B. W., Hrsg.). Cold Spring – Harbor Laboratory Press, New York.
2. Akerman, B., Jonsson, M. und Nordén. 1985. Electrophoretic orientation of DNA detected by linear dichroism spectroscopy. *J. Chem. Soc. D. Chem. Commun.* 422.
3. Aikens, R. 1992. Properties of low-light level slow-scan detectors in *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*. Mason, W. T. (Hrsg.) Harcourt Brace & Company, Cambridge, England.
4. Allen, M. J., Balooch, M., Subbrah, S., Tench, R. J., Sickhaus, W. und Balhorn, R. 1991. *Scanning Microsc.* 5: 625.
5. Ambrose, W. P., Goodwin, P. M., Jett, J. H., Johnson, M. E., Martin, J. C., Marrone, B. L., Schecker, J. A., Wilkerson, C. W. und Keller, R. A. 1993. Application of single molecule detection to DNA sequencing and sizing. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 97: 1535–1542.
6. Andersson-Engels, S., Johannson, J. und Svanberg, S. 1990. Multicolor fluorescence imaging systems for tissue diagnostics. *Proc. SPIE--Bioimag. Two-Dimens. Spectrosc.* 1205: 179–89.
7. Aurup, H., Tuschl, T., Benseler, F., Ludwig, J. und Eckstein, F. 1994. Oligonucleotide duplexes containing 2'-amino-2'-deoxycytidines: thermal stability and chemical reactivity. *Nucleic Acids Res.* 22: 20–4.
8. Arts, E., Kuiken, J., Jager, S. und Hoekstra, D. 1993. Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa. Specific involvement of the equatorial segment after acrosome reaction. *Eur. J. Biochem.* 217: 1001–9.
9. Bains, W. 1991. Hybridization methods for DNA sequencing. *Genomics*, 11: 294–301.
10. Bains, W. 1997. Hybridization for sequencing of DNA: In *Molecular Biology and Biotechnology*, R. A. Meyers, Hrsg. VCH Publishers, New York.
11. Balzarini, J., De Clercq, E., Ayusawa, D. und Seno, T. 1984. Thymidylate synthetase deficient mouse FM3A mammary carcinoma cell line as a tool for studying the thymidine salvage pathway and the incorporation of thymidine analogues into host cell DNA. *Biochem. J.* 217: 245–52.
12. Barbin, A., Laib, R. J. und Bartsch, H. 1985. Lack of miscoding properties of 7-(2 oxoethyl)guanine, the major vinyl chloride-DNA adduct. *Cancer Res.* 45: 2440–4.
13. Bello, M. S., de Besi, R., Rezzonico, R., Righetti, P. G. und Casiraghi, E. 1994. Electroosmosis of polymer solutions in fused silica capillaries. *Electrophoresis* 15: 623–6.
14. Bezrukov, S. M., Vodyanoy, I. und Parsegian, V. A. 1994. Counting polymers moving through a single ion channel. *Nature.* 370: 279.
15. Bick, M. D. und Davisdon, R. L. 1974. Total substitution of bromodeoxyuridine for thymidine in the DNA of a bromodeoxyuridine-dependent cell line. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 71: 2082–2086.
16. Bignold, L. P. 1987. A novel polycarbonate (Nuclepore) membrane demonstrates chemotaxis, unaffected by chemokinesis, of polymorphonuclear leukocytes in the Boyden chamber. *J of Immunological Methods.* 105: 275–280.
17. Bloom, L. B., Turner, J., Kelman, Z., Beechem, J. M., O'Donnell, M. und Goodman, M. F. 1996. Dynamics of loading the beta sliding clamp of DNA polymerase III onto DNA. *J. Biol. Chem.* 271: 30699–708.
18. Brick, G., Hilchenbach, M., Schauenstein, K. und West, G. 1985. Photometric analysis of antifading reagents for immunofluorescence with laser and conventional illumination sources. *J. of Histochemistry and Cytochemistry* 33: 699–705.
19. Böhmer, R. 1990. Cell division analysis using bromodeoxyuridine-induced suppression of Hoechst 33258 fluorescence. *Methods in Cell Biology* 18: 173–84.
20. Bruno, G., Capezzuto, P. und Madan, A. 1995. *Plasma deposition of amorphous silicon- based materials.* Academic Press, Boston.
21. Bustamante, C. 1991. Direct observation and manipulation of single DNA molecules using fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20: 415–46.
22. Buurman, E. P., Sanders, R., Draaijer, A. Van Veen, J. J. F., Hout, P. M. und Levine, Y. K. 1992. Fluorescence lifetime imaging using a confocal laser scanning microscope. *Scanning* 14: 155–59.
23. Cantor, C. R., Mirzabekov, A. und Southern, E. 1992. Report on the sequencing by hybridization workshop. *Genomics*, 13: 1378–1383.
24. Castro, A. und Shera, E. B. 1995. Single-molecule electrophoresis. *Anal. Chem.* 67: 3181–3186.
25. Chang, H. T. und Yeung, E. S. 1995. Dynamic control to improve the separation performance in capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 16: 2069–73.
26. When, D. und Dovichi, N. J. 1996. Single-molecule detection in capillary electrophoresis: molecular shot

- noise as a fundamental limit to chemical analysis. *Anal. Chem.* 68: 690–696.
27. Chu, G. Vollrath, D. und Davis, R. W. 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234: 1582.
 28. Church, G. M. und Kieffer-Higgins, S. 1988. Multiplex DNA sequencing. *Science* 240: 185–88.
 29. Clark, I., MacManus, J. P., Banville, D. und Szabo, A. G. 1993. A study of sensitized lanthanide luminescence in an engineered calcium-binding protein. *Anal. Biochem.* 210: 1–6.
 30. Clegg, R. M., Feddersen, B., Gratton, E. und Jovin, T. M. 1991. Time-resolved imaging microscopy. *Proc. SPIE--Int. Soc. Opt. Eng.* 1640: 448–460.
 31. Clegg, R. M. 1992. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods in Enzymology.* 211: 353–379.
 32. Clegg, R. M., Murchie, A. I. H., Zechel, A. und Uilley, D. M. J. 1993. Observing the helical geometry of doublestranded DNA in solution by fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 2994–98.
 33. Clegg, R. M. 1995. Fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Opin. Biotech.* 6: 103–110.
 34. Colson, P., Houssier, C. und Fredericq, E. 1974. *Biochim. Biophys. Acta* 340: 244–61.
 35. Crain, P. F. 1990. *Mass Spectrom. Rev.* 9: 505–54.
 36. Crissman, H. A. und Steinkamp, J. A. 1990. Detection of bromodeoxyuridine-labeled cells by differential fluorescence analysis of DNA fluorochromes. *Methods in Cell Biology* 33: 199–206.
 37. Cundall, R. B. und Dale, R. E. (1983). *Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy in Biochemistry and Biology.* Plenum, New York.
 38. Dash, J. G. 1975. *Films on solid surfaces: the physics and chemistry of physical adsorption.* Academic Press, New York.
 39. Davis, L., Fairfield, F., Hammond, M., Harger, C., Jett, J. und Keller, R. 1992. Rapid DNA sequencing based on single molecule detection. *Los Alamos Science* 20: 280–6.
 40. Davis, L. M., Fairfield, F. R., Harger, C. A., Jett, J. H., Keller, R. A., Hahn, J. H., Krakowski, L. A., Marrone, B. L., Martin, J. C., Nutter, H. L., Ratliff, R. L., Shera, E. B., Simpson, D. J. und Souper, S. A. 1991. *Genet. Anal. Tech. Appl.* 8: 1–7.
 41. de Jong, P. J., Vokobata, K., Chen, C., Lohman, F., Pedersen, L., McNinch, J. et al. 1989. *Cytogenet. Cell Genet.* 51: 985.
 42. Ding, D. W., Rill, R. und Van Holde, K. E. 1972. *Biopolymers* 11: 2109–2124.
 43. Dozier, J. 1988. HIRIS -- The high resolution imaging spectrometer. *Proc. SPIE Recent Adv. Sensors, Radiometry Data Process. Remote Sens.* 924 :10–22.
 44. Drmanac, R., Labat, I., Brukner, I. und Crkvenjakov, R. 1989. Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: theory of the method. *Genomics* 4: 114–128.
 45. Drmanac, R., Drmanac, S., Jarvis, J. und Labat I. 1994. Sequencing by hybridization. In *Automated DNA Sequencing and Analysis Techniques*, J Crag Ventor, Hrsg. Academic Press, London.
 46. Eiger, M. und Rigler, R.- 1994. Sorting single molecules: applications to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 5740–7.
 47. el-Deiry, W. S., et al., 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817–825.
 48. Faerber, P. und Scheit, K. H. 1971. *Chem. Ber.* 104: 456–460.
 49. Fairclough, R. H. und Cantor, C. R. 1978. The use of singlet-singlet energy transfer to study macromolecular assemblies. *Methods in Enzym.* 347–79.
 50. Fan, F. F. und Bard, A. J. 1995. Electrochemical detection of single molecules. *Science* 267: 871–4.
 51. Fawcett, J. J., Longmire, J. L., Martin, J. C., Deaven, L. L., und Cram, L. S. 1994. Large scale chromosome sorting. *Methods in Cell Biology* 42: 319–331.
 52. Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6–13.
 53. Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. 1984. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. (Addendum). *Anal. Biochem.* 137: 266–7.
 54. Ferreira, M. und Rubner, M. F. 1995. Molecular-level processing of conjugated polymers. 1. layer-by-layer manipulation of conjugated polymers. *ACS* 28: 7107–7114.
 55. Ferrell, T., Allison, D., Thundat, T. und Warmack, R. 1997. Scanning tunneling microscopy in sequencing of DNA. In *Molecular Biology and Biotechnology*, R. A. Meyers, Hrsg. VCH Publishers, New York.
 56. Foster, T. 1965. In *Modern Quantum Chemistry*, Bd. III (Sinanoglu, O., Ed.), pp. 93–137, Academic Press, New York.
 57. Fou, A. C. und Rubner, M. F. 1995. Molecular-level processing of conjugated polymers. 2. layer-by-layer manipulation of in-situ polymerized p-type doped conducting polymers. *ACS* 28: 7115–7120.
 58. Franklin, A. L. und Fillion, W. G. 1985. A new technique for retarding fading of fluorescence: DPX-BME. *Stain Technology* 60: 125–35.
 59. Frey, M. W., Sowers, L. C., Millar, D. P. und Benkovic, S. J. 1995. The nucleotide analog 2-aminopurine as

- a spectroscopic probe of nucleotide incorporation by the Klenow fragment of Escherichiacoli polymerase I and bacteriophage T4 DNA polymerase.
60. Fu, T. J., Sanders, G. M., O'Donnell, M. und Geiduschek, E. P. 1996. Dynamics of DNA tracking by two sliding-clamp proteins. *EMBO J.* 15: 4414–22.
 61. Gadella, T. W. J., Jovin, T. M. und Clegg, R. M. 1993. Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM): spatial resolution of microstructures on the nanosecond time scale. *Biophysical Chemistry.* 48: 221–239.
 62. Gains, H., Andersson, L. und Biberfeld, G. 1996. A new method for measuring lymphocyte proliferation at the singlecell level in whole blood cultures by flow cytometry. *J. of Immunological Meth.* 195: 63–72.
 63. Garini, Y., Katzir, N., Cabib, D. und Buckwald, A. A. 1996. Spectral bio-imaging. In *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy* (Wang, X.-F. und Herman, B., Hrsg.), John Wiley & Sons, New York.
 64. Garland, P. B. und Moore, C. H. 1979. Phosphorescence of protein-bound eosin and erythrosin: a possible probe for measurements of slow rotational motion. *Biochem. J.* 183, 561–572,
 65. Gawrisch, K., Han, K. H., Yang, J. S., Bergelson, L. D. und Ferretti, J. A. 1993. Interaction of peptide fragment 828–848 of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type I with lipid bilayers. *Biochemistry* 32: 3112–18.
 66. Gebeyehu, G, Rao, P. Y., SooChan, P., Simms, D. A. und Kievan, L. 1987. Novel biotinylated nucleotide–analogs for labeling and colorimetric detection of DNA. *Nucleic Acids Res.* 15: 4513–34.
 67. Gibson, T. J., Coulson, A. R., Sulston, J. E. und Little, R. F. R. 1987a. *Gene.* 53: 275.
 68. Gibson, T. J., Rosenthal, A. und Waterson, R. H. 1987b. *Gene* 53: 283.
 69. Gill, D. 1979. Inhibition of fading in fluorescence in microscopy of fixed cells. *Experientia* 35: 400–1.
 70. Gillam, I. C. und Tener, G. M. 1986. N4-(6-aminohexyl) cytidine and -deoxycytidine nucleotides can be used to label DNA. *Anal Biochem.* 157: 199–207.
 71. Giloh, H. und Sedat, J. W. 1982. Fluorescence microscopy; reduced photobleaching of rhodamine and fluorescenn protein conjugates by n-propyl gallate. *Science* 21 7: 1252–1255.
 72. Glazer, A. N. und Mathies, R. A. 1997. Energy-transfer fluorescent reagents for DNA analyses. *Current Opinion in Biotechnology* 8: 94–102.
 73. Glickman, B. W. 1985. *Basic Life Sciences.* 31: 353–79.
 74. Glover, D. M. und Hams, B. D. 1995. *DNA Cloning* 3. 1 RL Press, New York.
 75. Goodwin, P. M., Ambrose, W. P., Martin, J. C. und Keller, R. A. 1995. Spatial dependence of the optical collection efficiency in flow cytometry. *Cytometry.* 21: 133–144.
 76. Grafton, E. und Limkema, M. 1983. A continuously variable frequency cross-correlation phase fluorometer with picosecond resolution, *Biophys. J.* 44: 315–325.
 77. Griep, M. A. 1995. Fluorescence recovery assay: a continuous assay for processive DNA polymerases applied sp~cificaliy to DNA polymerase III holoenzyme. *Anal. Biochem.* 232: 180–9.
 78. Gubron, M., Eisinger, J. und Shulman, R. G. 1967. *J. Chem. Phys.* 47: 4077.
 79. Guilbault, G. G. 1973. (Hrsg.) *Practical fluorescence: theory, methods and techniques.* Marcel Dekker, New York.
 80. Gurrieri, S. Rizzarelli, E. Beach, D. und Bustamante, C. 1990. Imaging of kinked configurations of DNA molecules undergoing orthogonal field alternating gel electrophoresis by fluorescence microscopy. *Biochemistry* 29: 3396–3401.
 81. Haab, B. und Mathies, R. 1995. Single molecule fluorescence burst detection of DNA fragments separated by capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 67: 3253–60.
 82. Hamada, S. und Fujita, S. 1983. DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. *Histochemistry* 79: 219–26.
 83. Harding, J. D. und Keller, R. A. 1992. Single molecule detection as an approach to rapid DNA sequencing. *Trends Biotechnot* 10: 55–57.
 84. Harris, C. M. und Kell, D. B. 1985. On the dielectrically observable consequences of the diffusional motions of lipids and proteins inmembranes. 2. Experiments with microbial cells, protoplasts and membrane vesicles. *Eur. Biophys. J.* 13: 11–24.
 85. Haughland, R. P. 1996. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals.* Molecular Probes, Eugene.
 86. Herendeen, D. R und Kelly, T. J. 1996. DNA polymerase III: running rings around the fork. *Cell.* 84: 5–8.
 87. Herman, B., Wang, X. F., Periasamy, A., Kwon, S., Gordon, G. und Wodnicki, P. Fluorescence lifetime imaging in cell biology. *Proceedings of Optical Diagnostics of Living Cells and Biofluids* 2678: 88–97.
 88. Hogan, M., Dattagupta, N. und Crothers, D. M. 1978. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 75: 195–199.
 89. Höltkke, H.-J., Seibl, R., Burg, J., Mohlegger, K. und Kessler, C. 1990. Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids: II. Optimization of the digoxigenin system. *Mol. Gen. Hoppe-Seyler* 371: 929–938.
 90. Holzwarth, A. R. 1995. Time-resolved fluorescence spectroscopy. *Methods in Enzymology.* 246: 335–361.
 91. Holzwarth, G., Whitcomb, R. W., Platt, K. J., Crater, G. D. und McKee, C. B. 1990. Velocity of linear DNA during pulsed-field gel electrophoresis. In *Electrophoresis of Large DNA Molecules* (Lai, E. und Birren, B. W.,

Hrsg.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

92. Holzwarth, G., McKee, C. B., Steiger, S. und Crater, G. 1987. Transient orientation of linear DNA molecules during pulsed-field gel electrophoresis. *Biopolymers* 28: 1043.
93. Houseal, T. W., Bustamante, C., Stump, R. F. und Maestre, M. F. 1989. *Biophys. J.* 56: 507.
94. Huff, J. C., Weston, W. L. und Wanda, K. D. 1982. Enhancement of specific immunofluorescent findings with use of para-phenylenediamine mounting buffer. *J. of Investigative Dermatology* 78: 449–50.
95. Hung, S. C., Ju, J., Mathies, R. A. und Glazer, A. N. 1996. Cyanine dyes with high absorption cross section as donor chromophores in energy transfer primers. *Anal. Biochem.* 243: 15–27.
96. Ickhikawa, M., Iijima, T., und Matsumoto, G. 1993. Simultaneous 16, 384-site optical recording of neural activities in the brain. In *Brain Mechanisms of Perception and Memory: From Neuron to Behavior*. T. Ono, L. R. Squire, M. E. Raichle, D. I. Perrett & M. Fukuda (Hrsg). Oxford University Press, NY.
97. Ikehara, M., Tazawa, I. und Fukui, T. 1969a. *Chem. Hand. Bull. (Tokyo)*. 17: 1019–1024.
98. Ikehara, M., Tazawa, I. und Fukui, T. 1969b. *Biochemistry* 8: 73843.
99. Iijima, T., Ichikawa, M., & Matsumoto, G. 1989 *Abstr. Soc. Neurosci.* 15: 398.
100. Janesick, J. (1980–91) *Informal Notes*, Jet Propulsion Laboratory, California Institute of Technology, Pasadena, California.
101. Jett, J., Keller, R., Martin, J., Marrone, B., Moyzis, R., Ratliff, R., Seitzinger, N., Shera, E. und Stewart, C. 1989. High-speed DNA sequencing: an approach based upon fluorescence detection of single molecules. *J. of Bio. Structure & Dynamics* 7: 301–9.
102. Jett et al. 1995. US Patent No. 5405747.
103. Johnson, G. D., Davidson, R. S., McNamee, K. C., Russell, G., Goodwin, D. & Holborow, E. J. 1982. Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy. *J. of Immunological Methods* 55: 231–242.
104. Johnson, G. D. und Nogueira Araujo, G. M. de C. 1981. A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *J. of Immunological Methods* 43: 349–50.
105. Ju, J., Glazer, A. N. und Mathies, R. A. 1996a. Cassette labeling for facile construction of energy transfer fluorescent primers. *Nucleic Acids Res.* 24: 1144–8.
106. Ju, J., Glazer, A. N. und Mathies, R. A. 1996b. Energy transfer primers: a new fluorescence labeling paradigm for DNA sequencing and analysis. *Nature Medicine.* 2: 246–9.
107. Jumppanen, J. H. und Riekkola, M. L. 1995. Influence of electrolyte composition on the effective electric field strength in capillary zone electrophoresis – *Electrophoresis* 16: 1441–4.
108. Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D. und Deamer, D. W. 1996. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 13770–3.
109. Kato, H. und Yoshida, T. H. 1970. Nondisjunction of chromosomes in a synchronized cell population initiated by reversal of colcemid inhibition. *Expel. Cell Res.* 60: 459–64.
110. Keough, T., Baker, T. R., Dobson, R. L. M., Lacey, M. P., Riley, T., Hasselfield, J. und Hesselberth, P. E. 1993. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7: 195–200.
111. Kinjo, M. und Rigler, R. Ultrasensitive hybridization analysis using fluorescence correlation spectroscopy. *Nucleic Acids Research.* 23: 1795–1799.
112. Kirk, W. R., Wessels, W. S. und Prendergast, F. G. 1993. Lanthanide-dependent perturbations of luminescence in indolythylenediaminetetraacetic acid-lanthanide chelate. *J. Phys. Chem.* 97: 10326–10340.
113. Kienchin, V. A., Sukharev, S. I., Serov, S. M., Chernomordik, L. V. und Chizmadzhev, YuA. 1991. Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophysical J.* 60: 804–11.
114. Kochetkov, N. K., Budowsky und Shibaev, V. N. *Proc. Nucl. Acid Chem.* 1: 500–2.
115. Konuma, M. 1992. *Film Deposition by plasma techniques*. Springer-Verlag, New York.
116. Korchemnaya, E. K., Ermakov, A. N., Bochkova, L. P. 1978. *J. Anal Chem USSR (Eng. Übers.)* 33: 625.
117. Kornberg, A. und Baker, T. A. 1991. *DNA Replication* W. H. Freeman, New York.
118. Lakowicz, J. R. und Szmazinski, H. 1996. Imaging applications of time-resolved fluorescence spectroscopy. In *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy* (Wang, X. F. und Herman, B. Eds). John Wiley & Sons, New York.
119. Lakowicz, J. R. und Berndt, K. W. 1991. Lifetime-selective fluorescence imaging using an RF phase-sensitive camera. *Rev. Sci. Instru.* 62: 3653.
120. Lang, R. A., Robins, R. K. und Townsend, L. B. 1968. *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry.* 1: 228. Hrsg, Zorbach, W. W. und Tipson, R. S. John Wiley & Sons, New York.
121. Langer, P. R., Waldrop, A. A. und Ward, D. C. 1981. Enzymatic synthesis of biotin labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78-6633-6637.
122. Lee, K. B., Matsuoka, K., Nishimura, S; und Lee, Y. C: 1995. A new approach to assay endo-type carbohydrases: bifluorescent-labeled substrates for glycoamidases and ceramide glycanases. *Anal. Biochem.* 230: 31–6.
123. Lee, L. G., Connell, C. R., Woo, S. L., Cheng, R. D., McArdle, B. F., Fuller, C. W., Halloran, N. D. und

Wilson, R. K. *Nucleic Acids Res.* 20: 2471–2483.

124. Lee, S. P., Porter, D., Chirikjian, J. G., Knutson, J. R. und Han, M. K. 1994. A fluorometric assay for DNA cleavage reactions characterized with BamHI restriction endonuclease. *Anal. Biochem.* 220: 377–383.

125. Lee, S. P., Censullo, M. L., Kim, H. G., Knutson, J. R. und Han, M. K. 1995. Characterization of endonucleolytic activity of HIV-1 integrase using a fluorogenic substrate. *Anal. Biochem.* 227: 295301.

126. Lee, Y-H, Maus, R. G., Smith, B. W. und Winefordner, J. D. 1994. Laser-induced fluorescence detection of a single molecule in a capillary. *Anal.: Chem.* 66: 4142–9.

127. Lewotsky, K. 1994. Hyperspectral Imaging: evolution of imaging spectrometry. *SPIE OE/Rep.*, November: 1–3.

128. Little, D. P., Chorush, R. A., Speir, J. P., Senko, M. W., Kelleher, N. L. und McLafferty, F. W. 1994. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 4893–4897.

129. Livak, K. J. 1997. Quantitation of DNA/RNA using realtime PCR detection. Applied Biosystems, Foster City, CA.

130. Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T. et al., 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnol.* 14: 1675–1680.

131. Loros, J. J., Denome, S. A. und Dunlap, J. C. 1989. Molecular cloning of genes under control of the circadian clock in *Neurospora*. *Science* 243: 385–388.

132. Marcus, P. I. und Robbins, E. 1963. Viral inhibition in the metaphase-arrest cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50: 1156–64.

133. Marra, M., Weinstock, L. A. und Mardis, E. R. 1996. End sequence determination from large insert clones using energy transfer fluorescent primers. *Genome Research* 6: 1118–22.

134. Martin, I, Dubois, M-C., Defrie-Quertain, F., Saermark, T., Burny, A., Brasseur, R. und Ruyschaert, J-M. 1994. Correlation between fusogenicity of synthetic modified peptides corresponding to the NH₂-terminal extremity of simian immunodeficiency virus gp32 and their mode of insertion into the lipid bilayer: an infrared spectroscopy study. *J. Virol.* 68: 1139–48.

135. Mason, W. T. 1992. *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*. Harcourt Brace & Company, Cambridge, UK.

136. Matayoshi, E. D., Wang, G. T. Kraut, G. A. und Erickson, J. 1990. Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. *Science.* 247: 954.

137. Matsumoto, B. 1993. Cell biological applications of confocal microscopy. *Methods in Cell Biology.* 38: 86.

138. Matsumoto, S., Morikawa, K. und Yangida, M. 1981. Light microscopic structure of DNA in solution studied by the 4',6-diamidino-2-phenylindole staining method. *J. Mol. Biol.* 152: 501–516.

139. Maurizi, M. R., Kasprzyk, P. G. und Ginsberg, A. 1986. Distances between active site probes in glutamine synthetase from *Escherichiacok*. fluorescence energy transfer in free-and in stacked dodecamers. *Biochem.* 25: 141–151.

140. Mautner, H. G. 1956. *J. Am. Chem. Soc.* 78: 5293.

141. Maxam, A. M. und Gilbert, W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 560–4.

142. Maymon, W. und Neeck, S. P. 1988. Optical system design alternatives for the Moderate-Resolution Imaging Spectrometer Tilt (MODIS-T) for the Earth Observing System (EoS). *Proc. SPIE – Recent Adv. Sensors, Radiometry Data Process Remote Sens.* 924: 10–22.

143. McGown, L. B. 1989. Fluorescence lifetime filtering. *Anal. Chem.* 61: 839A–847A.

144. Meffert, R. und Dose, K. 1988. Uv-induced cross-linking of proteins to plasmid pBR322 containing 8-azidoadenine 2'-deoxyribonucleotides. *FEBS Letts.* 239: 190–4.

145. Meertz, J., Xu, C. und Webb, W. W. 1995. Single-molecule detection by two-photon excited fluorescence. *Optics Letters* 20: 2532–34.

146. Meinkoth, J. und Wahl, G. M. 1987. Nick translation. *Methods in Enzymology* 152: 91–94.

147. Menter, J. M., Hurst, R. E. und West, S. S. 1979. Photochemistry of heparin-acridine orange complexes in solution. *Photochemistry and Photobiology.* 27: 629–33.

148. Menter, J. M., Golden, J. F. & West, S. S. 1978. Kinetics of fluorescence fading of acridine orange-heparin complexes in solution. *Photochemistry and Photobiology* 27: 629–633.

149. Miki, M., O'Donoghue, S. I. und Dos Remedios, C. G. 1992. Structure of actin observed by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 13: 132.

150. Miki, M. und Iio, T. 1993. Kinetics of structural changes of reconstituted skeletal muscle thin filaments observed by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 268: 7101–7106.

151. Mitchinson, J. M. 1971. *The Biology of the Cell Cycle*. Cambridge University Press, London.

152. Moore, D. P., Schellman, J. A. und Baase, W. A. 1986. The orientation, relaxation and reptation of DNA in orthogonal field, alternately-pulsed field gel electrophoresis: a linear dichroism study." *Biophys. J.* 49: 130a.

153. Morikawa, K. und Yangida, M. 1981. *J. Biochem.* 89: 693.

154. Morcsanu, C. E. 1990. *Thin films by chemical vapour deposition*. Elsevier, New York.

155. Morgan, C. G., Mitchell, A. C. und Murray, J. G. 1990. Nanosecond time-resolved fluorescence microscopy: principle and practice. *Trans. R. Microsc. Soc. (Micro '90)* 463–466.
156. Nakashima, M., Yamada, S., Shiono, S. und Maeda, M. 1992. *IEEE Trans. Biomed. Engng.* 39: 26–36.
157. Naktinis, V., Turner, J., O'Donnell, M. 1996. A molecular switch in a replication machine defined by an internal competition for protein rings. *Celt* 84: 127–45.
158. Negishi, K., Matsumoto, K., Bessho, T., Tada, F. und Hayatsu, H. 1988. In vitro mutagenesis by incorporation of N4-aminodeoxycytidine 5'-triphosphate. *Nucleic Acids Symposium Series.* 19: 33–6.
159. Newman, J., Swiney, J. L., Day, L. A. 1977. *J. Mol. Biol.* 110: 119–46.
160. Nicolas, V., Nefussi, J. R., Collin, P. und Forest, N. 1990. Effects of acidic fibroblast growth factor and epidermal growth factor on subconfluent fetal rat calvaria cell cultures: DNA synthesis and alkaline phosphatase activity. *Bone and Mineral* 8: 145–56.
161. Nguyen, D. C. und Keller, R. A. Detection of single molecules of phycoerythrin in hydrodynamically focused flows by laser-induced fluorescence. *Anal Chem.* 59: 2158–2161.
162. Nie, S., Chiu, D. T. und Zare, R. N. 1994. Probing individual molecules with confocal fluorescence microscopy. *Science.* 266: 1018–21.
163. Oida, T., Sato, Y. und Kusumi, A. 1993. Fluorescence lifetime imaging microscopy (flimscopy): methodology development and application to studies of endosome fusion in single cells. *Biophys. J.* 64: 676–685.
164. Onrust, R. und O'Donnell, M. 1993. *J. Biol. Chem.* 268: 11766–72.
165. Pap, E. H. W., Bastiaens, P., Borst, J. W., van den Berg, P., van Hoek, A., Snoek, G., Wirtz, K und Visser, A. 1993. Quantitation of the interaction of protein kinase C with diacylglycerol and phosphoinositides by time-resolved detection of resonance energy transfer. *Biochemistry* 32: 13310–17.
166. Paul, W. Professor of Physics, Harvard University.
167. Pauleau, Y. 1995. *Materials and processes for surface and interface engineering.* Kluwer Academic Publishers, Boston.
168. Paz-Elizur, T., Skaliter, B., Blumenstein, S. und Livneh, Z. 1996. Beta*, a UV-inducible smaller form of the beta subunit sliding clamp of DNA polymerases III of *Escherichia coli*. I. Gene expression and regulation. *J. Biol. Chem.* 271: 2482–90.
169. Peck, K., Stryer, L., Glazer, A. N. und Mathies, R. A. 1989. Single-molecule fluorescence detection: auto-correlation criterion and experimental realization with phycoerythrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4087–4091.
170. Periasamy, A., Siadat-Pajouh, M., Wodnick, P., Wang, X-F. und Herman, B. Time-gated fluorescence microscopy for clinical imaging. *Microscopy and analysis.* 3: 33–4.
171. Periasamy, A. & Herman, B. 1994. Computerized fluorescence microscopic vision in the biomedical science, *J. of Computer-Assisted Microscopy* 6: 1–26.
172. Picciolo, G. L. und Kaplan, D. S. 1984. Reduction of fading of fluorescent reaction product for microphotometric quantitation. *Advances in Applied Microbiology* 30: 197–234.
173. Pillai, V. N. 1980. Photoremovable protecting groups in organic synthesis. *Synthesis.* 1980: 1.
174. Platt, J. L. und Michael, A. F. 1983. Retardation of fading and enhancement of intensity of immunofluorescence by p-phenylenediamine. *J. of Histochemistry and Cytochemistry* 31: 840–42.
175. Poot, M. und Hoehn, H. 1990. Cell cycle analysis using continuous bromodeoxyuridine labeling and Hoeschst 33258-ethidium bromide bivariate flow cytometry. *Methods in Cell Biology* 33: 185–98.
176. Porter, G. (Hrsg.) 1967. *Reactivity of the photoexcited organic molecule.* Interscience, New York.
177. Pringsheim, P. 1963. *Fluorescence and phosphorescence.* John Wiley, New York.
178. Priore, D. R. C. und Allen, F. S. 1979. *Biopolymers* 18: 1809–1820.
179. Purmal, A.; A., Kow, Y. W.; und Wallace, S. S. 1994. 5-Hydroxyprimidine deoxynucleoside triphosphates are more efficiently incorporated into DNA by exonuclease-free Klenow fragment than 8-oxopurine deoxynucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Res.* 22: 3930–5.
180. Purcell, E. M. 1985. *Electricity and Magnetism, Vol. 2* McGraw-Hill, New York.
181. Qu, D., et al., 1996. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380: 243–247.
182. Rahn, R. O., Schulman, R. G. und Longworth, J. W. 1965. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53: 893.
183. Rampino, N. J. und Chrambach, A. 1990. Apparatus for gel electrophoresis with continuous monitoring of individual DNA molecules by video epifluorescence microscopy. *Anal. Biochem.* 194: 278–283.
184. Rao, P. N. 1968. Mitotic synchrony in mammalian cells treated with nitrous oxide at high pressures. *Science* 160: 774–6.
185. Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C. und Berg, P. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113: 237–51.
186. Reddick, R. C., Warmack, R. J. und Ferrell, T. L. 1989. *Phys. Rev. B* 39: 767–770.
187. Rodgers, M. A. J. und Firey, P. A. 1985. *Photochem. Photobiol.* 42: 613.
188. Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., UhlBn, M. und Nyren, P. 1996. Real time DNA sequen-

- cing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* 242: 84–89.
189. Ross, P. D. und Scruggs, L. 1964. *Biopolymers.* 2: 231–6.
190. Rost, F. W. D. 1991. *Quantitative Fluorescence Microscopy.* Cambridge University Press, Cambridge.
191. Roychoudhury, R., Tu, C.-P.-D. und Wu, R. 1979. Influence of nucleotide sequence adjacent to duplex DNA termini on 3'-terminal labeling by terminal transferase. *Nucleic Acids Res.* 6: 1323–1333.
192. Saha, A. K., Kross, K., Kloszewski, E. D., Upson, D. A., Toner, J. L., Snow, R. A., Black, C. D. V. und Desai, V. C. 1993. Time-resolved fluorescence of a new europium chelate complex: demonstration of highly sensitive detection of protein and DNA samples. *J. Am. Chem. Soc.* 115: 11032–33.
193. Sahota, fl. S. und Khaledi, M. G. 1994. Nonaqueous capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 66: 1141–6.
194. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350–1354.
195. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–91.
196. Sanger, F., Nickten, A. und Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463–7.
197. Sase, I., Miyata, H., Corrie, J., Craik, J und Kinoshita, Jr., K. K. 1995. Real time imaging of single fluorophores on moving actin with an epifluorescence microscope. *Biophys. J.* 69: 323–8.
198. Scheit, K. H. 1980. *Nucleotide Analogs: Synthesis and Biological Function.* John Wiley & Sons, New York.
199. Schellman, J. A. und Jensen, H. P. 1987. Optical spectroscopy of oriented molecules. *Chem. Rev.* 87: 1359.
200. Schott, J. R. 1989. Remote sensing of the Earth: A synoptic view. *Phys Today* September: 72–79.
201. Schwartz, D. C. und Koval, M. 1989. Conformational dynamics of individual DNA molecules during gel electrophoresis. *Nature* 338: 520–522.
202. Selvin, P. R., Rana, T. M. und Hearst, J. E. 1994. Luminescence resonance energy transfer. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 6029–30.
203. Selvin, P. R. 1995. Fluorescence resonance energy transfer. *Methods in Enzymology.* 246: 300–334.
204. Shera, E. B., Seitzinger, N. K., Davis, L. M., Keller, R. A. und Soper, S. A. 1990. Detection of single fluorescent molecules. *Chem. Phys. Letts.* 174: 553–57.
205. Shikmus, M. L., Guaglianone, P. und Herman, T. M. 1986. Synthesis and characterization of biotin-labeled nucleotide analogs. *DAM.* 5: 247–55.
206. Skaliter, R., Bergstein, M. und Livneh, Z. 1996. Beta*, a UV-inducible shorter form of the beta subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*. II. Overproduction, purification, and activity as a polymerase processivity clamp. *J. Biol. Chem.* 271: 2491–6.
207. Skoog, D. A., West, D. M. und Holler, F. J. 1992. *Analytical Chemistry.* Saunders College Publishing, New York.
208. Smirnov, I. P., Roskey, M. T., Juhasz, P., Takach, E. J., Martin, S. A. und Haff, L. A. 1996. Sequencing oligonucleotides by exonuclease digestion and delayed extraction matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 238: 19–25.
209. Smith, D. P., Shieh, B. H. und Zuker, C. S. 1990. Isolation and structure of an arrestin gene from *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1003–1007.
210. Smith, S. B., Burrieri, S. und Bustamante, C. 1990. Fluorescence microscopy and computer simulations of DNA-molecules in conventional and pulsed-field gel electrophoresis. In *Electrophoresis of Large DNA Molecules* (Lai, E. und Birren, B. W., Hrsg.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
211. Smith, S. B., Aldridge, P. K. und Calls, J. B. 1989. Observation of Individual DNA molecules undergoing gel electrophoresis. *Science* 243: 203–206.
212. Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, B. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., Heiner, C., Kent, S. B. und Hood, L. E. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 321: 674–9.
213. Sober, H. A. Hrsg. 1970. *Handbook of Biochemistry*, 2nd ed. The Chemical Rubber Co., Cleveland.
214. Soper, S. A., Davis, L. M. und Shera, E. B. 1992. Single molecule spectroscopy in solution. *Los Alamos Science* 20: 286–96.
215. Spatz, W. B. und Grabig, S. 1983. Reduced fading of fast blue fluorescence in the brain of the guinea-pig by treatment with sodium-nitroprusside. *Neuroscience Letters* 38: 1–4.
216. Spohr, B. 1990. *Ion tracks and microtechnology: principles and applications* Vieweg, Braunschweig.
217. Steinberg, I. Z. 1971. *Annu. Rev. Biochem.* 40: 83.
218. Steiner, B. F. und Weinryb, I. 1971. *Excited States of Proteins and Nucleic Acids.* Plenum Press, New York.
219. Stewart, J. E., Hahn, G. M., Parker, V. und Bagshaw, M. A. 1968. Chinese hamster cell monolayer cell cultures. *Exp. Cell Res.* 49: 293–299.

220. Stuart, B. V. 1983. Vacuum technology thin films, and sputtering: an introduction. Academic Press, New York.
221. Stryer, L. 1978. Annual Review of Biochem. 47: 819.
222. Stubblefield, E. 1968. Synchronization methods for mammalian cellcultures. – In Methods in Cell Physiology Ed. by D. M. Prescott. 3: 25–43. Academic Press, New York.
223. Sturm, J. und Well, G. 1989. Direct observation of DNA chain orientation and relaxation by electric birefringence: implications for the mechanism of separation during pulsed field gel electrophoresis. Phys. Rev. Lett. 62: 1484.
224. Taliani, M., Bianchi, E., Narjes, F., Fossatelli, M., Urbani, A., Steinköler, C., De Francesco, R. und Pessi, A. 1996. A continuous assay of hepatitis C virus protease based on resonance energy transfer dipeptide substrates. Anal. Biochem. 240: 60–7.
225. Taylor, D. L. und Salmon, E. D. 1989. Methods in Cell Biol. 29: 207–37
226. Taylor, D. L., Beidler, J., Spudich, J. A. und Stryer, L. 1981. Detection of actin assembly by fluorescence energy transfer. J. Cell Biol. 89: 363.
227. ter Beest, M. und Hoekstra, D. 1993. Interaction of myelin basic protein with artificial membranes. Parameters governing binding, aggregation and dissociation. Eur. J. Biochem. 211: 689–96.
228. Theil, E. 1997. Automation in genome research. In Molecular Biology and Biotechnology, R. A. Meyers, Hrsg. VCH Publishers, New York.
229. Thomas, R. S., Shimkunas, A. R. und Manger, P. E. 1992. Subnanosecond intensifier gating using heavy and mesh cathode underlays. Proc. Int. Congr. High Speed Photo. Photon 19th. 19974.
230. Tian, R. und Rodgers, M. A. J. (1991). Time-resolved fluorescence microscopy. In New Techniques in Optical Microscopy and Spectrophotometry (R. J. Cherry, Ed.), pp. 312–351. OBO Press, Boca Raton, FL.
231. Tinoco, I., Sauer, K. und Wang, J. C. 1995. Physical Chemistry Prentice Hall, Englewood Cliffs.
232. Tu, C.-P.-D. und Cohen, S. 1980 3'-End labeling of DNA with [α -³²P] cordycepin-5'-triphosphate. Gene 10: 177–83.
233. Uchiyama, H., Hirano, K., Kashiwasake-Jibu, M. und Taira, K. 1996. Detection of undegraded oligonucleotides in vivo by fluorescence resonance energy transfer. J. Biol. Chem. 271: 380–84.
234. Udenfriend, S. 1962. Fluorescence assay in biology and medicine. Academic Press, New York und London.
235. Ueda, T., Miura, K., Imazawa, K. und Odajima, K. 1974. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 22: 2377–2382.
236. Valiev, K. A. 1992. The physics of submicron lithography. Plenum Press, New York.
237. Valnes, K. und Brandtzaeg, P. 1985. Retardation of immunofluorescence fading during microscopy. J of Histochemistry and Cytochemistry 33: 755–761.
238. van Hulst, N. F., Moers, M. H. P., Noordman, O. F. J., Tack, R. G., Segerink, F. B. und Bolder, B. 1993. Appl. Phys. Lett. 62: 461
239. van de Ven, M. und Gratton, E. 1992. Time-resolved fluorescence lifetime imaging. In Optical Microscopy: Emerging Methods and Applications (B. Herman und J. J. Lemaster, Hrsg.), 373–402. Academic Press, San Diego.
240. Vaughan, W. M. und Weber, G. 1970. Oxygen quenching of pyrenebutyric acid fluorescence in water. A dynamic probe of the microenvironment. Biochemistry 9: 464–473.
241. Waggoner, A. 1995. Covalent labeling of proteins and nucleic acids with fluorophores. Methods in Enzymology 246: 362–373.
242. Wang et al., 1995. Discovery of adrenomedullin in ratschematic cortex and evidence for its role in exacerbating focal brain ischemic damage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1003–1007.
243. Wang, S. Y. 1976. Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids. Academic Press, New York.
244. Wang, X. F., Periasamy, A., Wodnicki, P., Gordon, G. W. und Herman, B. 1996. Time resolved fluorescence lifetime imaging microscopy: instrumentation and biomedical applications. In Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy (Wang, X. F. und Herman, B. Hrsg.). John Wiley & Sons, Inc., New York.
245. Wang, X. F., Periasamy, A., Wodnicki, P., Gordon, G. W. und Herman, B. 1996. Time resolved fluorescence lifetime imaging microscopy: instrumentation and biomedical applications. Chemical Analysis 137: 313–350.
246. Wang, X. F., Kitajima, S., Uchida, T., Coleman, D. M. und Minami, S. 1990. Time resolved fluorescence microscopy using multichannel photon counting. Appl. Spectrosc. 44: 25.
247. Wang, Y., Wallin, J. M., Ju, J., Sensabaugh, G. F. und Mathies, R. A. 1996. High resolution capillary array electrophoretic sizing of multiplexed short tandem repeat loci using energy-transfer fluorescent primers. Electrophoresis. 17: 1485–90.
248. Wang, Y., Ju, J., Carpenter, B. A., Atherton, J. M., Sensabaugh, G. F. und Mathies, R. A. 1995. Rapid sizing of short tandem repeat alleles using capillary array electrophoresis and energy-transfer fluorescent primers. Anal. Chem. 67: 1197–203.
249. Ward, D. C. und Reich, E. 1969. Fluorescence studies of nucleotides and polynucleotides. 244:

1228–1237.

250. Weimann, S., Rupp, T., Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C. und Ansorge, W. 1995. Primer design for automated DNA sequencing utilizing T7 DNA polymerase and internal labeling with fluorescein-15-dATP. *Biotechniques* 18: 688–97.
251. Wilkinson, J. Q., Lanahan, M. B., Conner, T. W. und Klee, H. J. 1995. Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. *Plant Mol. Biol.* 27: 1097–1108.
252. Wittwer, C. T., Herman, M. G., Moss, A. A. und Rasmussen, R. P. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 22: 130–1, 134 8.
253. Wooley, A. T. und Mathies, R. A. 1995. Ultra-high-speed DNA sequencing using capillary -electrophoresis chips. *Anal. Chem.* 67: 3676–3680.
254. Woronicz, J. D., Calnan, B., Ngo, V. und Winoto, A. 1994. Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* 367: 277–281.
255. Wu, H. M., Dattagupta, N. und Crothers, D. M. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6808–6811.
256. Wu, P. G. und Brand, L. 1994. Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal. Biochem.* 218: 1–13.
257. Wunderlich, F. und Peyk, D. 1969. Antimitotic agents and macronuclear division of ciliates. II. Endogenous recovery from colchicine and colcemid—a new method of synchronization in *Tetrahymena pyriformis* GL. *Expl. Cell Res.* 57: 142–4.
258. Yanagida, M., Hiraoka, Y. und Katsura, I. 1983. *Cold Spring Harbor Symp. Biol.* 47: 177–87.
259. Yamaoka, K. und Matsuda, K. 1981. *Macromolecules* 14: 595–601.
260. Yamaoka, K. und Charney, E. 1973. *Macromolecules* 6: 66–76.
261. Vane, G., Chrien, T. G., Reimer, J. H., Green, R. O. und Conel, J. E. 1988. Comparison of laboratory calibrations of the Airborne Visible/Infrared Imaging Spectrometer (AVIRIS) at the beginning and end of the first flight season. *Proc. SPIE-Recent Adv. Sensors, Radiometry Data Process. Remote Sens.* 924: 168–178.
262. Zweig, A. 1973. Photochemical generation of stable fluorescent compounds (photofluorescence). *Pure and Applied Chemistry* 33: 389–410.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Analyse eines Polymers aus verbundenen Einheiten, umfassend:

- (1) das Bereitstellen eines Polymers aus mit einheitsspezifischen Markern markierten verbundenen Einheiten, wobei die einheitsspezifischen Marker spezifisch mit einem oder mehreren Einheiten eines Polymers wechselwirken, um diese Einheiten zu identifizieren, und wobei die Wechselwirkung zwischen den einheitsspezifischen Markern und dem Polymer während der gesamten Analyse des Polymers aufrechterhalten wird;
- (2) das Detektieren von Signalen von einheitsspezifischen Markern von weniger als allen verbundenen Einheiten;
- (3) das Speichern einer Signatur der detektierten Signale und das Analysieren der Signale, um das Polymer zu analysieren.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei mehrere einheitsspezifische Marker einer Station gegenüber ausgesetzt werden, um ein Nichtionenleitungssignal zu erzeugen, das aus der Exposition der einheitsspezifischen Marker der Station gegenüber resultiert, und wobei die Station an einem Wandmaterial befestigt ist, das eine einen Kanal definierende Oberfläche aufweist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei mehrere einzelne Einheiten des Polymers aus verbundenen Einheiten relativ zu einer Station bewegt werden, um Signale zu erzeugen, die bei einer feststellbaren physikalischen Änderung in dem Polymer oder der Station entstehen, wenn einzelne Einheiten die Station zur Analyse des Polymers passieren.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei mehrere einheitsspezifische Marker einem Mittel gegenüber ausgesetzt werden, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle zur Erzeugung eines detektierbaren Signals.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei eine Einheit des Polymers identifizierender einheitsspezifischer Marker vorübergehend einem Mittel gegenüber ausgesetzt wird, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle, wobei die Identität der einzelnen Einheit unbekannt ist, um eine Wechselwirkung mit einem für die individuelle Einheit charakteristischen detektierbaren Signal aus elektromagnetischer Strahlung hervorzurufen, und Unterscheiden des Signals von Signalen, die von benachbarten signalerzeugenden Einheiten des Polymers hervor-

gerufen werden als Hinweis auf die Identität der einzelnen Einheit.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polymer aus verbundenen Einheiten vorübergehend relativ zu der Station bewegt wird, wobei die Identität einer mit einem einheitsspezifischen Marker markierten Einheit des Polymers unbekannt ist, um das Signal hervorzurufen, das durch eine detektierbare physikalische Änderung in dem einheitsspezifischen Marker oder der Station entsteht, und Unterscheiden des Signals von Signalen, die durch das Aussetzen von benachbarten signalerzeugenden Einheiten des Polymers der Station gegenüber entstehen als Hinweis auf die Identität der Einheit.

7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polymer relativ zu der Station bewegt wird, um einheitsspezifische Marker, die mindestens zwei Einheiten identifizieren, der Station gegenüber auszusetzen, um charakteristische Signale, die durch eine detektierbare physikalische Änderung in dem einheitsspezifischen Marker oder der Station entstehen, zu erzeugen, und Messen der zwischen charakteristischen Signalen vergangenen Zeit, wobei die vergangene Zeit auf die Nähe der zwei Einheiten hinweist.

8. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polymer linear relativ zu der Station bewegt wird, um einheitsspezifische Marker, die eine erste Einheit und eine zweite Einheit identifizieren, der Station gegenüber auszusetzen, um ein erstes und ein zweites durch eine detektierbare physikalische Änderung in den einheitsspezifischen Markern oder der Station entstehendes Signal zu erzeugen, wobei das zweite Signal von dem ersten Signal verschieden ist, und Feststellen der Reihenfolge der Signale als Hinweis auf die Reihenfolge der zwei Einheiten.

9. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polymer dazu veranlaßt wird, eine Station linear zu passieren, (2) um ein charakteristisches Signal zu erzeugen, das erzeugt wird, wenn jede der zwei Einheiten die Station passiert, und (3) Messen der zwischen den Signalen vergangenen Zeit, (4) Wiederholen der Schritte 1, 2 und 3 für eine Mehrzahl ähnlicher Polymere, um einen Datensatz herzustellen, und (5) Bestimmen des Abstandes zwischen den zwei einzelnen Einheiten auf Basis der Information, die durch Analyse des Datensatzes für die Mehrzahl der ähnlichen Polymere erhalten wurde.

10. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polymer linear relativ zu der Station bewegt wird, (2) wobei ein polymerabhängiger Impuls gemessen wird, der erzeugt wird, wenn jeder der zwei einheitsspezifischen eine erste Einheit und eine zweite Einheit identifizierenden Marker, die jeder ein charakteristisches Signal verursachen, die Station passiert, (3) Wiederholen der Schritte 1 und 2 für eine Mehrzahl von ähnlichen Polymeren, und (4) Bestimmen der Reihenfolge von mindestens zwei Einheiten auf Basis der Information, die von den ähnlichen Polymeren erhalten wurde.

11. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Signale linear detektiert werden.

12. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Signatur der Signale aus mindestens 10 Signalen besteht.

13. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Signatur der Signale die Reihenfolge der einheitsspezifischen Marker definiert.

14. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Signatur der Signale den Abstand zwischen einheitsspezifischen Markern definiert.

15. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Signatur der Signale die Anzahl der einheitsspezifischen Marker definiert.

16. Verfahren nach Anspruch 1, wobei alle einheitsspezifischen Marker detektiert werden.

17. Verfahren nach Anspruch 1, wobei nur ein Teil der einheitsspezifischen Marker detektiert wird.

18. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polymer teilweise und zufällig mit einem einheitsspezifischen Marker markiert ist.

19. Verfahren nach Anspruch 17, wobei alle Einheiten des Polymers mit einem einheitsspezifischen Marker

markiert sind.

20. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das markierte Polymer aus verbundenen Einheiten einem Mittel gegenüber ausgesetzt wird, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle und einer Fluoreszenzanregungsquelle, und wobei die Signale durch die Wechselwirkung zwischen einem einheitsspezifischen Marker des Polymers und dem Mittel erzeugt werden.

21. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das markierte Polymer aus verbundenen Einheiten in bezug auf eine Station bewegt wird, und wobei die Signale auf die Aussetzung eines einheitsspezifischen Markers des Polymers der Station gegenüber hervorgerufen werden.

22. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Verfahren ein Verfahren zur Identifizierung eines einheitsspezifischen Markers des Polymers ist, wobei die Identität des einheitsspezifischen Markers auf die Identität von mindestens einer Einheit des Polymers hinweist, und wobei der einheitsspezifische Marker vorübergehend einer Station gegenüber ausgesetzt wird, um Signale zu erzeugen, die charakteristisch für den einheitsspezifischen Marker sind, und ferner umfassend den Schritt des Unterscheidens des Signals von Signalen, die von benachbarten signalerzeugenden einheitsspezifischen Markern des Polymers erzeugt wurden, als Hinweis auf die Identität des einheitsspezifischen Markers.

23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die Station ein Mittel ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus elektromagnetischer Strahlung, einer Dämpfungsquelle, und einer Fluoreszenzanregungsquelle, und wobei die Signale detektierbare Signale elektromagnetischer Strahlung sind.

24. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Verfahren ein Verfahren zur Bestimmung der Nähe von zwei einheitsspezifischen Markern des Polymers ist, wobei die Nähe der zwei einheitsspezifischen Marker die Signatur der Signale ist, wobei die Identität jedes einheitsspezifischen Markers auf die Identität von mindestens einer Einheit des Polymers hinweist, wobei das markierte Polymer relativ zu einer Station bewegt wird, um die zwei einheitsspezifischen Marker der Station gegenüber auszusetzen, um ein charakteristisches Signal zu erzeugen, das bei einer detektierbaren physikalischen Änderung in dem einheitsspezifischen Marker oder der Station entsteht, und ferner umfassend den Schritt des Messens der zwischen der Detektion jedes charakteristischen Signals vergangenen Zeit, wobei die vergangene Zeit auf die Nähe der zwei einheitsspezifischen Marker hinweist.

25. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Verfahren ein Verfahren zur Bestimmung der Reihenfolge von zwei Sequenzeinheitsmarkern des Polymers ist, wobei die Identität jedes einheitsspezifischen Markers auf die Identität von mindestens einer Einheit des Polymers hinweist, wobei die Reihenfolge der zwei einheitsspezifischen Marker die Signatur des Signals ist, wobei das markierte Polymer linear in bezug auf eine Station bewegt wird, um einen der einheitsspezifischen Marker der Station gegenüber auszusetzen, um ein Signal zu erzeugen, das eine Signatur des Signals ist, und um den anderen einheitsspezifischen Marker der Station gegenüber auszusetzen, um ein zweites feststellbares Signal zu erzeugen, das eine sich von dem ersten Signal unterscheidende Signatur des Signals ist, und ferner umfassend den Schritt der Bestimmung der Reihenfolge der Signale als Hinweis auf die Reihenfolge der zwei einheitsspezifischen Marker.

26. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Verfahren ein Verfahren zur Bestimmung des Abstandes zwischen zwei einheitsspezifischen Markern des Polymers ist, wobei die Identität jedes einheitsspezifischen Markers auf die Identität mindestens einer Einheit des Polymers hinweist, wobei der Abstand zwischen zwei einheitsspezifischen Markern die Signatur des Signals ist, wobei das markierte Polymer linear relativ zu einer Station bewegt wird, um ein charakteristisches Signal zu erzeugen, das hervorgerufen wird, wenn jeder der zwei einheitsspezifischen Marker die Station passiert, und ferner umfassend den Schritt der Bestimmung des Abstandes zwischen den Signalen als Hinweis auf den Abstand zwischen den zwei einheitsspezifischen Markern.

27. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Signal elektromagnetische Strahlung ist.

28. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das Mittel elektromagnetische Strahlung ist.

29. Verfahren nach Anspruch 4, wobei ein Teil der mehreren einheitsspezifischen Marker mit einem Fluorophor markiert ist.

30. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die mehreren einheitsspezifischen Marker durch Bringen der mehreren einheitsspezifischen Marker in die Nähe einer lichtemittierenden Verbindung und Aussetzen der lichte-

mittlerenden Verbindung elektromagnetischer Strahlung gegenüber der Reihe nach elektromagnetischer Strahlung ausgesetzt werden, und wobei die mehreren einheitsspezifischen Marker die Emission elektromagnetischer Strahlung von der lichtemittierenden Verbindung detektierbar beeinflussen.

31. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die mehreren einheitsspezifischen Marker der Reihe nach elektromagnetischer Strahlung ausgesetzt werden, und wobei die elektromagnetische Strahlung die Emission elektromagnetischer Strahlung von den mehreren einheitsspezifischen Markern zur Erzeugung des detektierbaren Signals beeinflusst.

32. Verfahren nach Anspruch 30, wobei die die Emission von elektromagnetischer Strahlung von der lichtemittierenden Verbindung beeinflussenden einheitsspezifischen Marker mit einem Fluorophor markiert sind.

33. Verfahren nach Anspruch 30, wobei die lichtemittierende Verbindung an einem festen Material befestigt ist.

34. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die mehreren einheitsspezifischen Marker der Reihe nach durch Bewegen des Polymers durch einen Nanokanal in einem Wandmaterial dem Mittel gegenüber ausgesetzt werden, und Aussetzen der mehreren einheitsspezifischen Marker dem Mittel gegenüber an einer Wechselwirkungsstation an dem Nanokanal.

35. Verfahren nach Anspruch 34, wobei das Polymer durch einen Nanokanal in einem Wandmaterial bewegt wird, das eine lichtemittierende Verbindung in dem dem Nanokanal benachbarten Wandmaterial eingebettet aufweist, wobei die mehreren einheitsspezifischen Marker mit der lichtemittierenden Verbindung wechselwirken, wenn das Polymer sich durch den Nanokanal bewegt.

36. Verfahren nach Anspruch 34, wobei das Wandmaterial eine Mehrzahl von Nanokanälen, eine Wechselwirkungsstation an dem Nanokanal umfaßt, und ferner umfassend das Bewegen einer Mehrzahl einheitsspezifischer Marker durch den Nanokanal mit nur einem Polymer pro Nanokanal zu einer gegebenen Zeit, und das gleichzeitige Detektieren der Signale, die aus der Wechselwirkung zwischen individuellen Einheiten des Polymers und dem Mittel an der Wechselwirkungsstation resultieren.

37. Verfahren nach Anspruch 27, ferner umfassend das Vergleichen detektierter Signale mit einem Muster von Signalen von anderen Polymeren, um die Verwandtschaft zwischen den zwei Polymeren zu bestimmen.

38. Verfahren nach Anspruch 27, ferner umfassend das Vergleichen der detektierten Signale mit einem bekannten Muster von Signalen, das für ein bekanntes Polymer charakteristisch ist, um die Verwandtschaft des analysierten Polymers mit dem bekannten Polymer zu bestimmen.

39. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die mehreren einheitsspezifischen Marker zwei Einheiten sind, eine erste Einheit an einem ersten Ende des Polymers und eine zweite Einheit an einem gegenüberliegenden zweiten Ende des Polymers.

40. Verfahren nach Anspruch 39, ferner umfassend das Messen der zwischen der Detektion eines ersten Signals von der ersten Einheit und eines zweiten Signals von der zweiten Einheit vergangenen Zeitdauer.

41. Verfahren nach Anspruch 27, ferner umfassend das Bestimmen der zwischen der aufeinanderfolgenden Detektion der Signale vergangenen Zeit.

42. Verfahren nach Anspruch 27, wobei ein erster einheitsspezifischer Marker mit dem Mittel wechselwirkt, um ein erstes detektierbares Signal zu erzeugen, und ein zweiter einheitsspezifischer Marker mit dem Mittel wechselwirkt, um ein zweites detektierbares Signal zu erzeugen, das sich von dem ersten detektierbaren Signal unterscheidet.

43. Verfahren nach den Ansprüchen 1–42, wobei das Polymer eine Nukleinsäure ist.

44. Verfahren nach den Ansprüchen 1–42, wobei mindestens zwei Einheiten des Polymers verschieden markiert sind, um zwei verschiedene detektierbare Signale zu erzeugen.

45. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die mehreren einheitsspezifischen Marker mindestens zwei Mitteln gegenüber ausgesetzt werden, wobei die Wechselwirkung zwischen den einheitsspezifischen Markern und

den mindestens zwei Mitteln mindestens zwei Signale erzeugt.

46. Verfahren nach Anspruch 45, wobei die mindestens zwei Mittel in bestimmten Bereichen eines Kanals angeordnet sind, durch den die Polymere passieren.

47. Verfahren nach Anspruch 45, wobei die mindestens zwei Signale verschiedene Signale sind.

48. Verfahren nach Anspruch 45, wobei die mindestens zwei Signale dieselben Signale sind.

49. Verfahren nach Anspruch 34, wobei der Nanokanal in der Wand fixiert ist.

50. Verfahren nach Anspruch 4, wobei der einheitsspezifische Marker dem Mittel gegenüber an einer Station ausgesetzt wird, und wobei die Station ein Nicht-Liganden-Material ist.

51. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Station eine Wechselwirkungsstation ist und wobei einheitsspezifische Marker an der Wechselwirkungsstation einem Mittel gegenüber ausgesetzt werden, das mit den einheitsspezifischen Markern wechselwirkt, um ein detektierbares Signal aus elektromagnetischer Strahlung zu erzeugen, das charakteristisch für die Wechselwirkung ist.

52. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Station eine Signalerzeugungsstation ist und das erzeugte charakteristische Signal ein polymerabhängiger Impuls ist.

53. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Mittel ein oder mehrere Fluorophore ist und der einheitsspezifische Marker vorübergehend durch Anordnen des einheitsspezifischen Markers innerhalb von Energietransferferne des Mittels exponiert wird, und wobei das Signal durch Detektion des Fluoreszenzenergie transfers zwischen dem Mittel und dem einheitsspezifischen Marker bestimmt wird.

54. Verfahren nach Anspruch 53, wobei das Mittel mindestens drei Fluorophore ist.

55. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der einheitsspezifische Marker des Polymers dem Mittel durch Anordnen des einheitsspezifischen Markers an einer Wechselwirkungsstation ausgesetzt wird, die einen Nanokanal in einem Wandmaterial umfaßt.

56. Verfahren nach Anspruch 55, wobei das Wandmaterial zwei Schichten umfaßt, wobei eine der Schichten leitend ist und die andere nichtleitend ist, und wobei der Nanokanal beide Schichten durchzieht.

57. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Station eine Signalerzeugungsstation ist und das erzeugte Signal ein polymerabhängiger Impuls ist.

58. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Mehrzahl ähnlicher Polymere eine homogene Population ist.

59. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Mehrzahl ähnlicher Polymere eine heterogene Population ist.

60. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Mehrzahl ähnlicher Polymere zufallsmarkiert ist.

61. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das Polymer eine Nukleinsäure ist.

62. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Schritte (1)–(4) im wesentlichen gleichzeitig ausgeführt werden.

63. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Station eine Wechselwirkungsstation ist und die Wechselwirkungsstation ein Nanokanal ist.

64. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Station eine Signalerzeugungsstation ist.

65. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Station eine Wechselwirkungsstation ist.

66. Verfahren nach Anspruch 10, wobei Schritt (2) das Messen eines erzeugten Signals elektromagnetischer Strahlung umfaßt.

67. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Mehrzahl ähnlicher Polymere eine homogene Population ist.

68. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Mehrzahl ähnlicher Polymere eine heterogene Population ist.

69. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Polymer eine Nukleinsäure ist.

70. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Bestimmungsschritt das Bestimmen aufeinanderfolgender Signale einheitsspezifischer Marker von weniger als allen der verbundenen Einheiten umfaßt.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

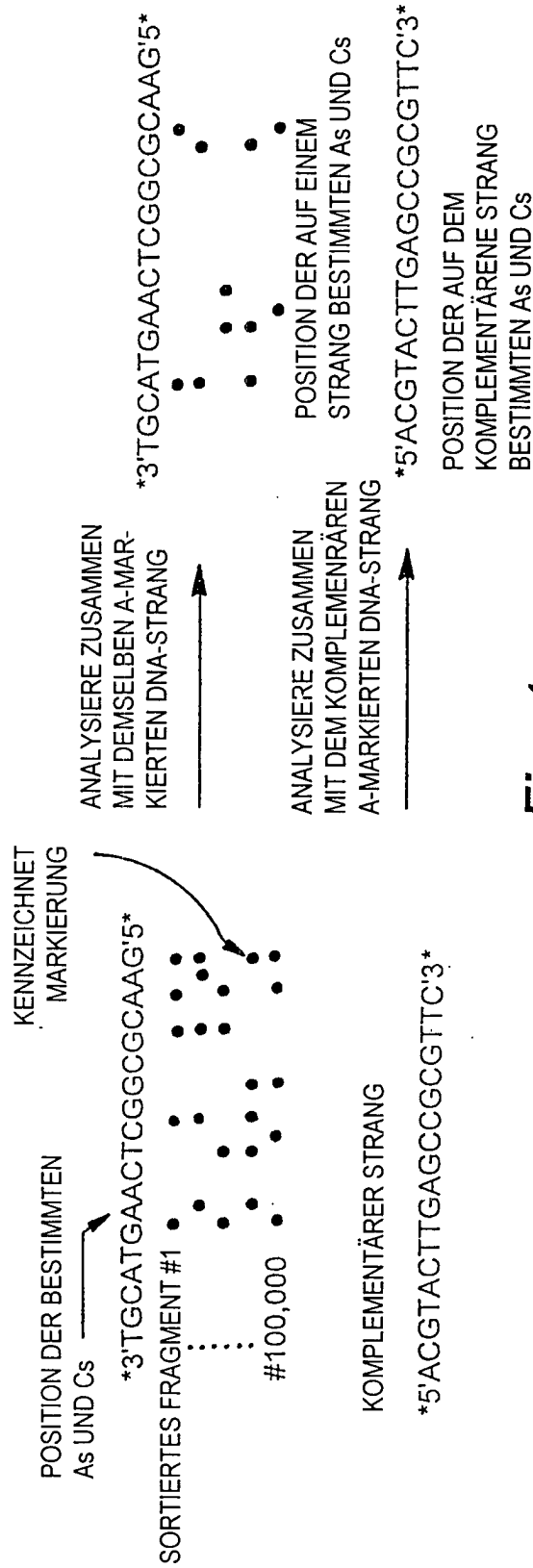
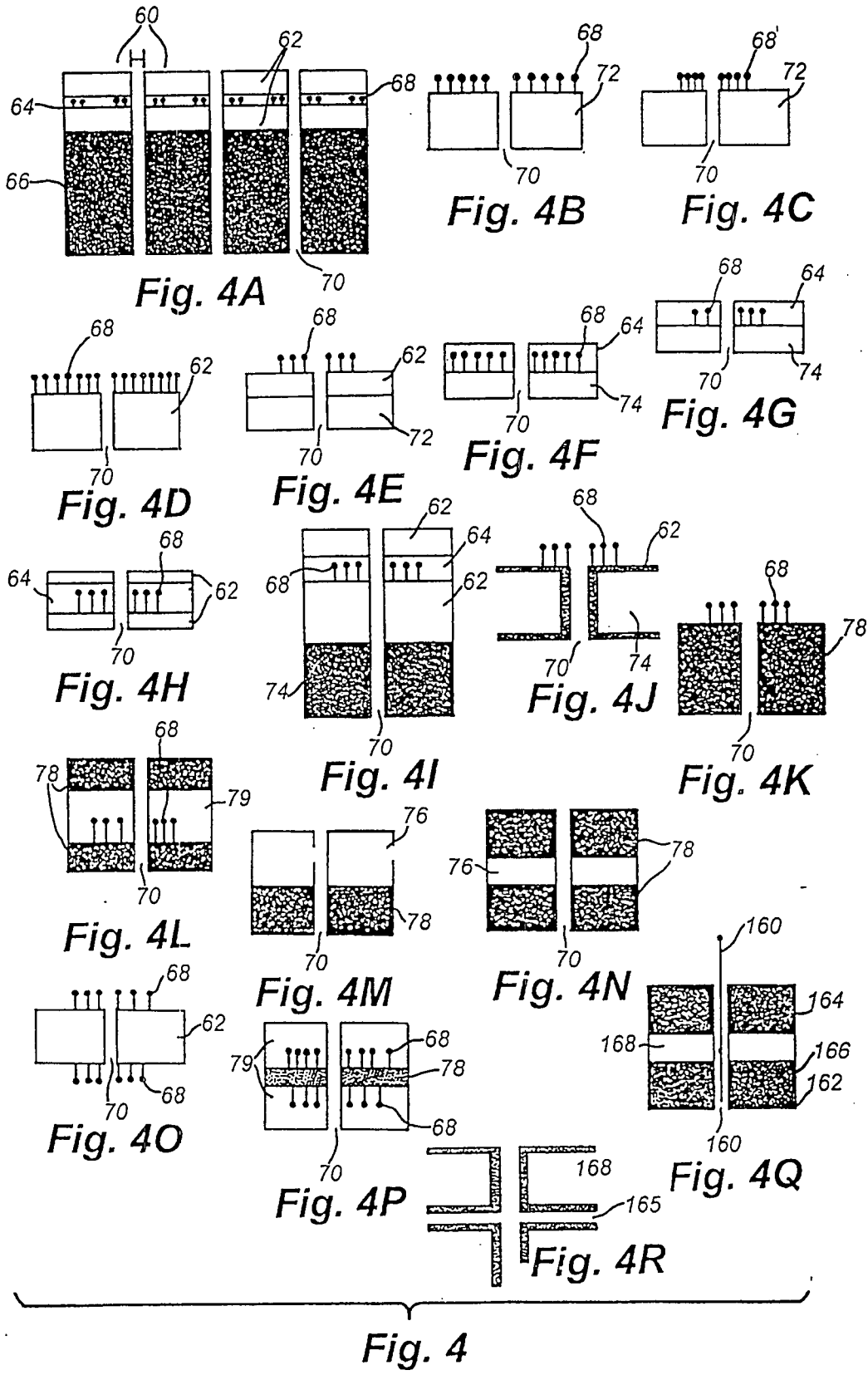


Fig. 1



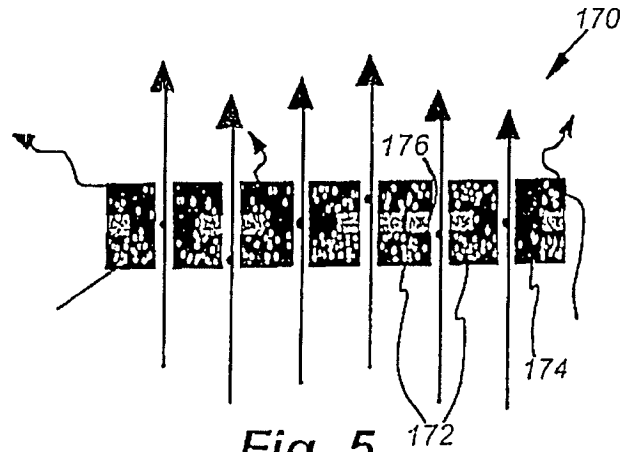


Fig. 5

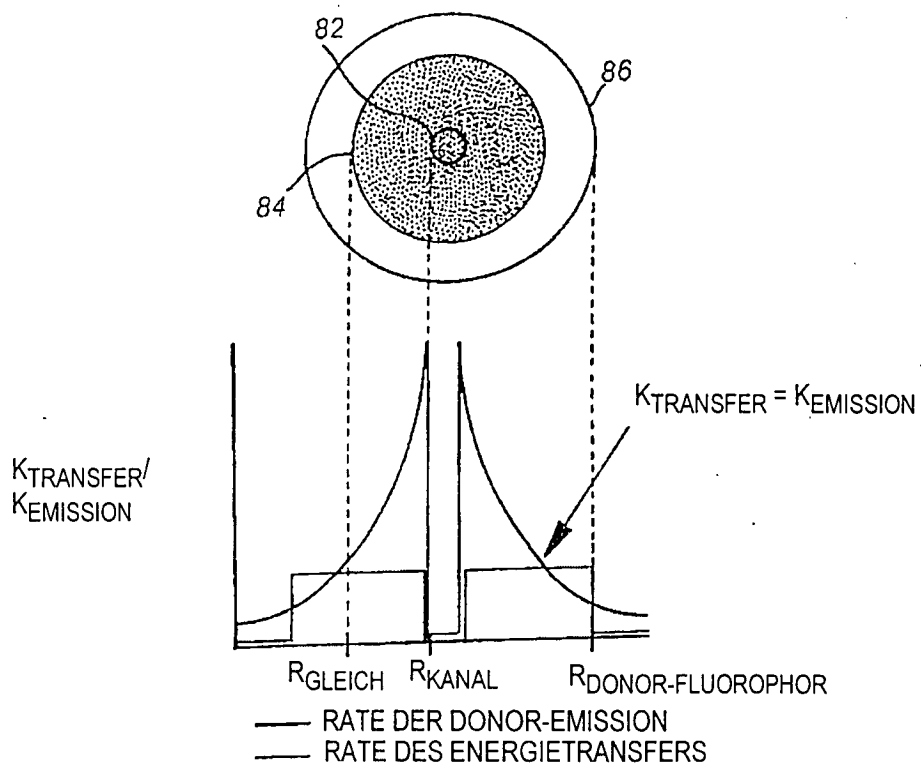
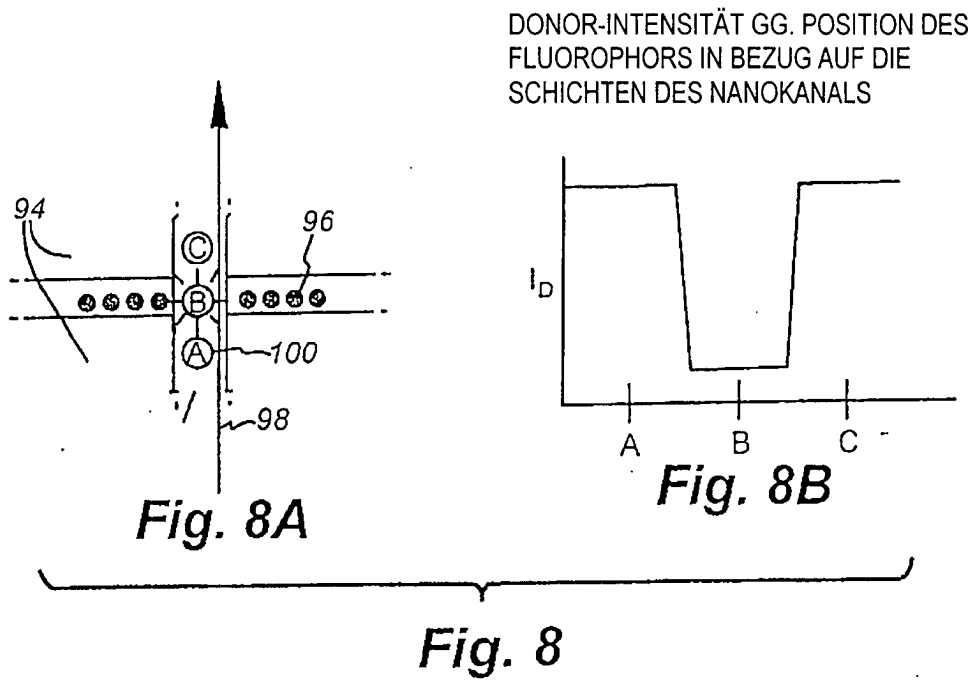
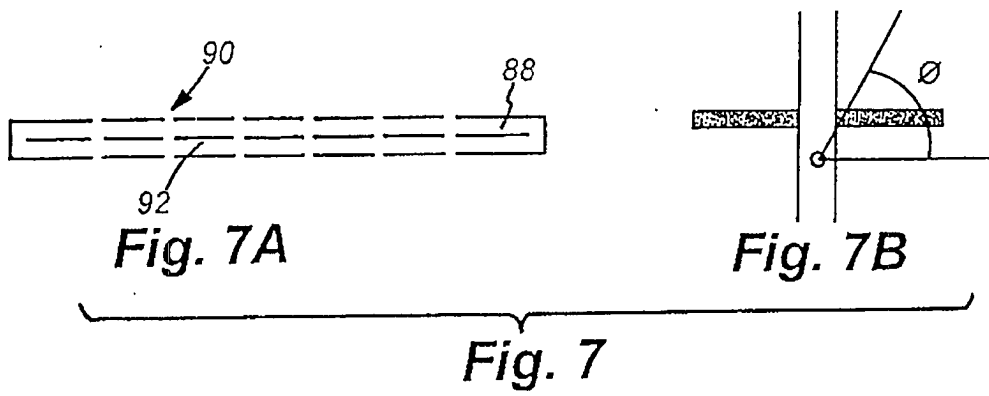


Fig. 6



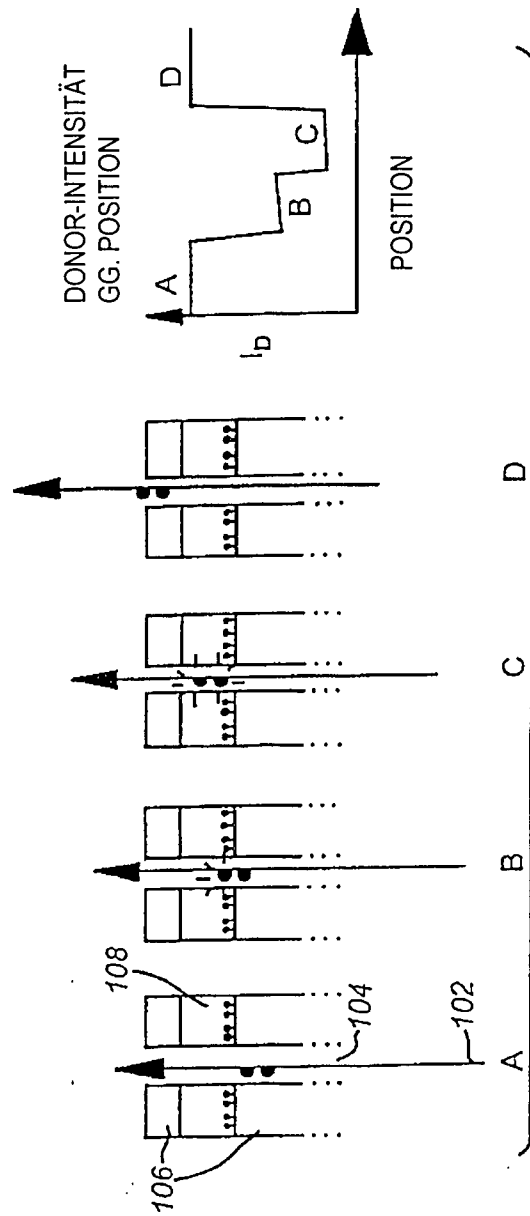


Fig. 9

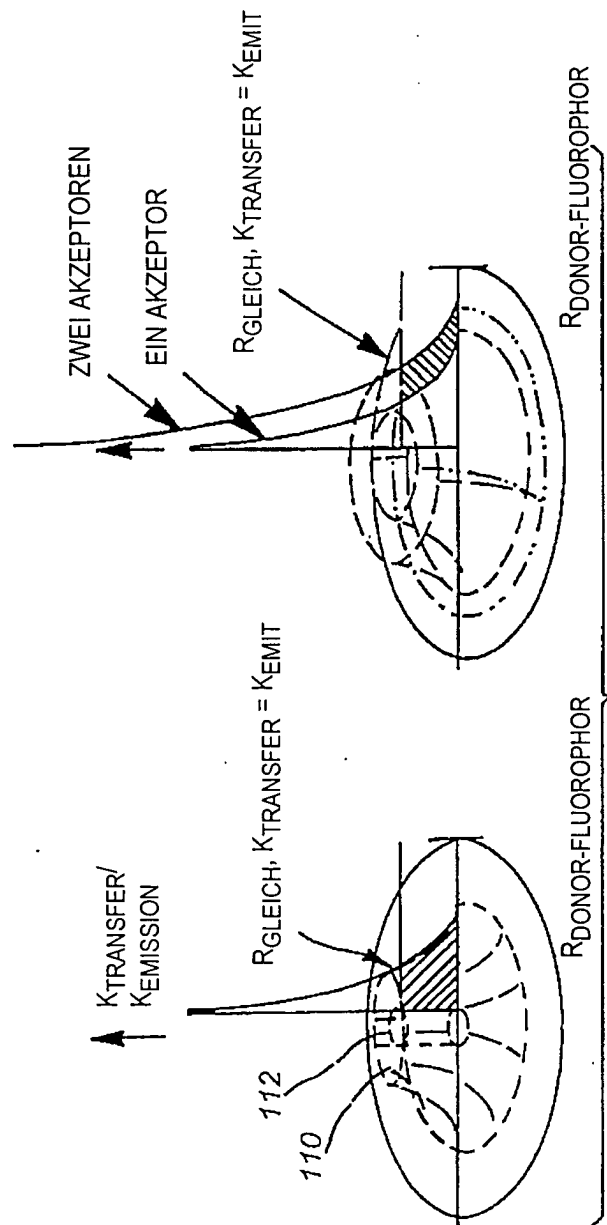


Fig. 10

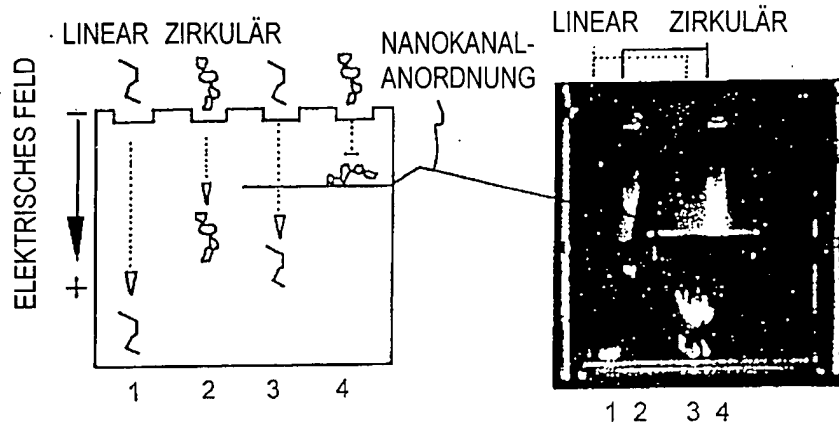


Fig. 11

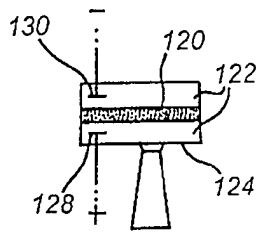


Fig. 12

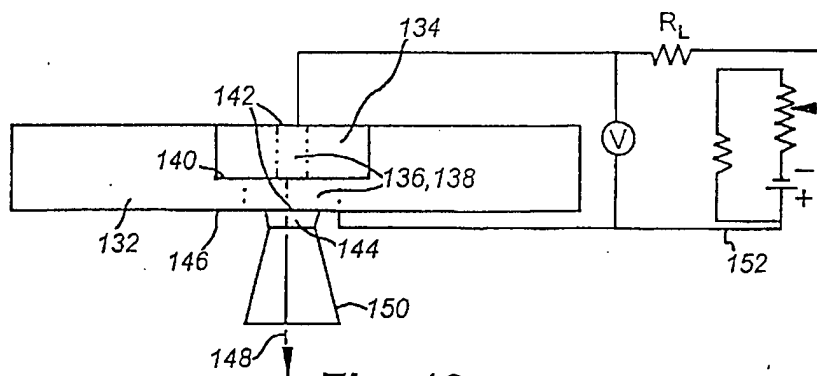


Fig. 13

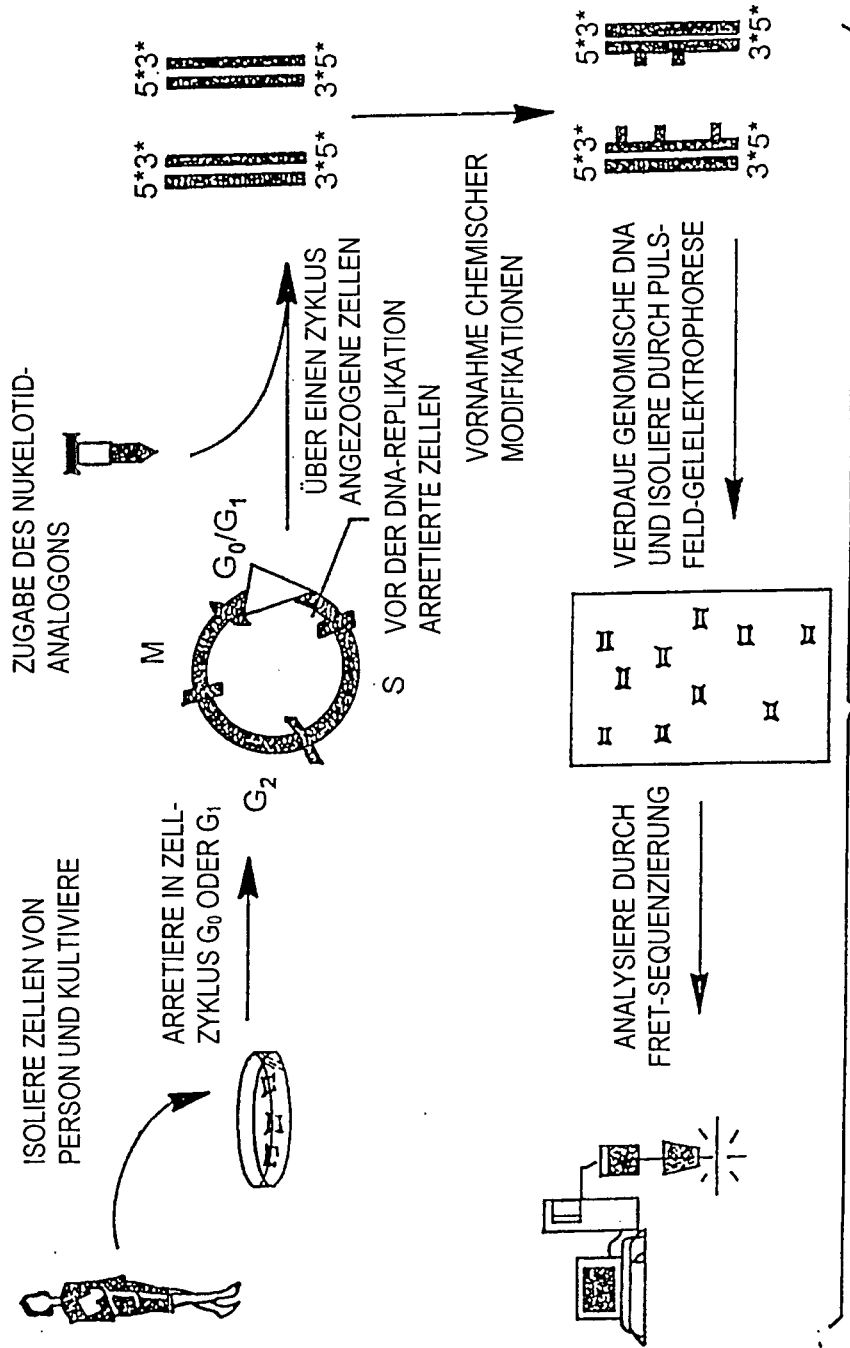


Fig. 14

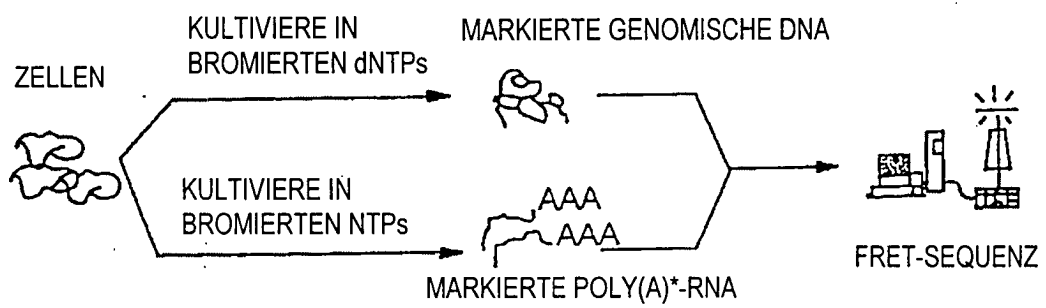


Fig. 15